

平成 29 年度 博士論文

認知機能を高める海馬グリコーゲンローディングの開発  
：パターン分離能評価のラットモデルを用いて

人間総合科学研究科 体育科学専攻

次世代健康スポーツ科学学位プログラム

201530491 征矢 茉莉子

# 目次

目次.....	2
List of Table.....	7
List of Figures.....	8
List of Appendices .....	9
略称と記号.....	10
関連論文 .....	13
第1章 緒言.....	14
第2章 先行研究.....	18
1. 末梢組織の貯蔵糖質：グリコーゲン.....	18
1-1. 筋および肝グリコーゲン.....	18
1-2. 筋グリコーゲン分解・ATP 合成.....	18
1-3. 肝グリコーゲン分解・ATP 合成.....	19
1-4. 筋および肝グリコーゲン合成.....	21
1-5. 運動後の筋グリコーゲン超回復.....	22
1-5-1. 筋グリコーゲン再合成の急速期 .....	23
1-5-2. 筋グリコーゲン再合成緩徐期.....	24
2. グリコーゲンローディング.....	25
3. 脳のグリコーゲン代謝 .....	27
3-1. 脳におけるグリコーゲンの存在.....	27
3-2. 解糖系.....	27
3-3. 脳グリコーゲン分解・合成 .....	28
3-4. 運動時の脳グリコーゲン代謝.....	30
3-5. 脳グリコーゲンの生理的意義.....	31
3-6. 運動が高める海馬機能.....	32
3-6-1. 海馬の構造.....	33
3-6-2. 海馬の機能.....	34
3-6-3. 運動による海馬機能向上効果.....	34
第3章 研究目的および課題.....	38

1.	研究目的	38
2.	研究課題	38
第4章	GLが脳グリコーゲン量に及ぼす影響（研究課題1）	42
1.	目的	42
2.	方法	42
2-1.	被験動物および飼育	42
2-2.	走行学習	42
2-3.	GL	43
2-4.	持久性能力測定	45
2-5.	マイクロ波照射	45
2-6.	組織の採取	45
2-7.	グリコーゲンおよびグルコース濃度の定量	46
2-7-1.	グルコースの抽出	46
2-7-2.	グリコーゲンの抽出	46
2-7-3.	グルコース濃度の測定	47
2-7-4.	グリコーゲン濃度の計算	47
2-8.	統計処理	47
3.	結果	48
3-1.	筋および肝グリコーゲン量	48
3-2.	持久性能力	48
3-3.	脳部位別のグリコーゲン量	48
4.	考察	50
5.	要約	51
第5章	GL期間中の海馬グリコーゲン動態の検討（研究課題2-1）	52
1.	目的	52
2.	方法	53
2-1.	被験動物および飼育条件	53
2-2.	走行学習	53
2-3.	GL	53
2-4.	マイクロ波照射	54
2-5.	組織の採取	54
2-6.	グリコーゲンおよびグルコース濃度の定量	54

2-7. 統計処理.....	55
3. 結果.....	56
3-1. 筋・肝・海馬・視床下部および皮質グリコーゲン量 .....	56
4. 考察.....	57
5. 要約.....	57
<b>第6章 GLにおける高糖質食が海馬グリコーゲン量に及ぼす影響（研究課題2-2）</b> .....	<b>59</b>
1. 目的.....	59
2. 方法.....	59
2-1. 被験動物および飼育条件.....	59
2-2. 走行学習.....	60
2-3. GL.....	60
2-4. マイクロ波照射.....	63
2-5. 組織の採取 .....	63
2-6. 血糖値の測定 .....	63
2-7. グリコーゲンおよびグルコース濃度の定量 .....	63
2-8. 統計処理.....	63
3. 結果.....	64
3-1. 総摂食量、総摂取カロリー、総糖質摂取量、体重および血糖値 .....	64
3-2. 筋、肝、海馬、視床下部および皮質グリコーゲン量 .....	66
3-3. 糖質摂取量と筋・肝・海馬・視床下部および皮質グリコーゲン量の相関 .....	67
4. 考察.....	68
5. 要約.....	70
<b>第7章 GLにおける運動が海馬グリコーゲン量に及ぼす影響（研究課題2-3）</b> .....	<b>71</b>
1. 目的.....	71
2. 方法.....	71
2-1. 被験動物および飼育条件.....	71
2-2. 走行学習.....	72
2-3. GL.....	72
2-4. マイクロ波照射.....	73
2-5. 組織の採取 .....	73
2-6. グリコーゲンおよびグルコース濃度の定量 .....	73
2-7. 統計処理.....	73

3. 結果.....	74
3-1. 筋、肝、海馬、視床下部および皮質グリコーゲン量 .....	74
4. 考察.....	75
5. 要約.....	76
第8章 海馬グリコーゲン量増加に必要な運動条件の検討（研究課題2-4） .....	77
1. 目的.....	77
2. 方法.....	77
2-1. 被験動物および飼育条件.....	77
2-2. 走行学習.....	78
2-3. GL.....	78
2-4. マイクロ波照射.....	80
2-5. 組織の採取 .....	80
2-6. グリコーゲンおよびグルコース濃度の定量 .....	80
2-7. 統計処理.....	80
3. 結果.....	81
3-1. 筋、肝、脳グリコーゲン量 .....	81
4. 考察.....	82
5. 要約.....	84
第9章 新奇物体再認テストを用いてパターン分離能を評価する高類似度課題の確立 （研究課題3-1） .....	85
1. 目的.....	85
2. 方法.....	86
2-1. 被験動物および飼育条件.....	86
2-2. 群分け .....	86
2-3. 新奇物体再認テスト（NOR） .....	86
2-4. 統計処理.....	86
3. 結果.....	86
3-1. 各オブジェクトにおける新奇物体識別率.....	86
4. 考察.....	86
5. 要約.....	86
第10章 海馬GLが海馬の司るパターン分離能に及ぼす影響（研究課題3-2） .....	87
1. 目的.....	87

2. 方法.....	87
2-1. 被験動物および飼育条件.....	87
2-2. 群分け.....	87
2-3. 走行学習.....	87
2-4. 海馬 GL.....	87
2-5. 新奇物体再認テスト.....	87
2-6. 統計処理.....	87
3. 結果.....	88
3-1. 低類似度課題.....	88
3-1-1. 総探索行動量.....	88
3-1-2. 新奇物体識別率.....	88
3-2. 高類似度課題.....	88
3-2-1. 総探索行動量.....	88
3-2-2. 新奇物体識別率.....	88
4. 考察.....	88
5. 要約.....	88
第11章 総合討論.....	89
第12章 総括.....	97
謝辞.....	100
参考文献.....	101

## List of Table

表 1	走行学習プロトコル.....	43
表 2	食餌中の栄養成分.....	62
表 3	食餌中の糖質、脂質および蛋白質比 .....	62

## List of Figures

図 1	本研究の仮説図 .....	17
図 2	研究課題 1 実験デザイン .....	44
図 3	GL が筋、肝臓および脳グリコーゲン量と持久性能力に及ぼす影響.....	49
図 4	研究課題 2 – 1 実験デザイン .....	54
図 5	GL 期間中の筋、肝臓および脳グリコーゲン量の経時的变化 .....	56
図 6	研究課題 2 – 2 実験デザイン .....	61
図 7	GL における糖質濃度の異なる食餌が総摂食量、総摂取カロリー量、総糖質摂取量、 体重および血糖値に及ぼす影響.....	65
図 8	筋、肝臓および脳グリコーゲン量 .....	66
図 9	総糖質摂取量と筋、肝臓および脳グリコーゲン量との相関関係.....	67
図 10	研究課題 2 – 3 実験デザイン .....	72
図 11	GL における運動が筋、肝臓および脳グリコーゲン量に及ぼす影響.....	74
図 12	研究課題 2 – 4 実験デザイン .....	79
図 13	GL 期間中の運動条件が筋、肝臓および脳グリコーゲン量に及ぼす影響 .....	81
図 24	本研究のまとめ .....	96



## List of Appendices

Appendix 1:研究課題 1 における血糖値.....	116
Appendix 2 : 研究課題 1 における筋および肝グリコーゲン量 .....	117
Appendix 3 : GL が持久性能に及ぼす効果.....	118
Appendix 4 : 研究課題 1 における脳部位別グリコーゲン量.....	119
Appendix 5 : 研究課題 2 - 1 における各組織のグリコーゲン量.....	120
Appendix 6 : 研究課題 2 - 2 における基礎データ.....	121
Appendix 7 : 研究課題 2 - 2 における血糖値.....	122
Appendix 8 : 研究課題 2 - 2 における各組織のグリコーゲン量.....	123
Appendix 9 : 研究課題 2 - 3 における各組織のグリコーゲン量.....	124
Appendix 10 : 研究課題 2 - 4 における各組織のグリコーゲン量.....	125
Appendix 11 : 研究課題 3 - 1 における新奇物体識別率 .....	126
Appendix 12 : 研究課題 3 - 2 低類似度課題での総探索行動量 .....	127
Appendix 13 : 研究課題 3 - 2 低類似度課題での新奇物体識別率.....	128
Appendix 14 : 研究課題 3 - 2 高類似度課題での総探索行動量 .....	129
Appendix 15 : 研究課題 3 - 2 高類似度課題での新奇物体識別率.....	130

## 略称と記号

- **GL**  
Glycogen loading. 持久性アスリートの試合前1週間のコンディショニング法であり、高糖質食と疲労困憊運動を含む運動を組み合わせることで、筋グリコーゲン量を増加させ、持久性運動パフォーマンスを向上させる。
- **ADP**  
Adenosine diphosphate. アデノシン二リン酸。アデニン、リボース、および二つのリン酸分子からなる化学物質。リン酸は高エネルギーリン酸結合をとっている。ATP から ADP とリン酸基に分解される際に放出されるエネルギーは、生物体の反応素過程において必ず利用されている。
- **AMP**  
Adenosine monophosphate. アデノシン一リン酸。AMP は拡散塩基のアデニン、五炭糖のリボース、リン酸により構成されている。RNA 中に見られるヌクレオチドの一種である。
- **AMPK**  
AMP-activated protein kinase. AMP 活性化プロテインキナーゼ。セリン/スレオニンキナーゼに属し、細胞内のエネルギーセンサーとして働き、エネルギーバランスを調節している。
- **ATP**  
Adenosine triphosphate. アデノシン三リン酸。生物体で用いられるエネルギー保存および利用に関するヌクレオチドであり、すべての神格生物がこれを直接利用する。
- **cAMP**  
Cyclic adenosine monophosphate. 環状アデノシン一リン酸。アデノシン三リン酸から合成される。グルカゴンやアドレナリンといったホルモン伝達の際に、細胞内シグナル伝達においてセカンドメッセンジャーとして働く。

- **G-1-P**  
**Glucose 1-phosphate.** グルコース 1 リン酸。1 位の炭素がリン酸化したグルコース分子のことである。グリコーゲン分解では、グリコーゲンホスホリラーゼの作用によってグリコーゲン分子から直接切り出される。細胞内で使用するために、ホスホグルコムターゼの作用によって **G-1-P** は **G-6-P** に変換される。グリコーゲン分解の際、グルコースではなく **G-1-P** が切り出される理由の 1 つは、リン酸化されたグルコースは極性が大きく、細胞膜を通過できなくなるためである。
- **G-6-P**  
**Glucose 6-phosphate.** グルコース-6 リン酸。6 位の炭素がリン酸化したグルコース分子のことである。細胞内には多量に存在し、細胞に取り込まれたグルコースのほとんどがリン酸化を受けて **G-6-P** になる。多くの生物ではヘキソキナーゼにより、また、高等動物では肝臓中のグルコキナーゼの酵素機能によって触媒される。この反応では一分子の ATP が消費される。
- **GLUT**  
**Glucose transporter.** 糖輸送単体。細胞内へのグルコース取り込みと細胞外への放出を担うタンパク質。様々なサブタイプがある。肝臓では GLUT 2、筋肉には GLUT 4、ニューロンでは GLUT 3、アストロサイトでは GLUT 1 と GLUT 4 が主な役割を果たす。
- **MCT**  
**Monocarboxylic acid transporter.** モノカルボン酸輸送単体。全身のあらゆる細胞に存在し、乳酸やケトン体などのモノカルボン酸の輸送に関与する。アストロサイトに存在する MCT 1 や 4 は乳酸を細胞外に放出し、ニューロンに存在する MCT 2 は細胞外の乳酸の取り込みに働く。
- **PTG**  
**Protein targeting to glycogen.** 非インスリン依存性にグリコーゲン合成酵素の活性化に関与するタンパク質。

- **NA**  
Noradrenalin. ノルアドレナリン作動性神経の神経伝達物質。
- **MHPG**  
NA 作動性神経の代謝産物。

## 関連論文

1. **Mariko Soya**, Takashi Matsui, Takeru Shima, Subrina Jesmin, Naomi Omi and Hideaki Soya. Hyper-hippocampal glycogen induced by glycogen loading with exhaustive exercise. *Scientific Reports*, 8:1285, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-19445-4.

## 第1章 緒言

持久性能力や認知機能はヒトの重要な能力である。これらの機能低下は高齢者や疾患者のみならず、近年は子どもにおいても見られることから社会的な問題となっているが、この問題に対する有望策として運動が注目されている。習慣的な運動は持久性能力のみならず、認知機能を高めることが多くの研究で報告されており、様々なヒトに適した運動プログラムの提案を可能とするために、更に効果的な運動条件に関する詳細な検討が行われている (van Praag et al., 1999; Lee et al., 2012; Byun et al., 2014; Inoue et al., 2014; Kujach et al., 2018)。しかし、認知機能向上に効果的な運動の条件や栄養・休養の取り方を総合的に検討した研究は未だになく、これらを調整することにより短期間で効率的に認知機能を高めるコンディショニング法の開発が期待される。

近年、持久性能力と認知機能が相関することが明らかとなり (Hillman et al., 2008; Lee et al., 2012; Hyodo et al., 2016; Suwabe et al., 2017a)、持久性能力を高めるコンディショニング法が認知機能をも高める可能性が考えられる。持久性能力を高めるコンディショニング法の代表格として「グリコーゲンローディング (GL)」が知られ (Costill et al., 1981)、古くから多くの持久性アスリートに実践されている。貯蔵糖質である筋グリコーゲンはその貯蔵量が持久性能力に影響を及ぼすことから運動時の重要なエネルギー源と考えられており (Ahlborg et al., 1967; Bergström et al., 1967; Hermansen et al., 1967)、筋グリコーゲン量を増加させる運動や栄養条件が検討されてきた。筋グリコーゲンは激しい運動により減少し、その後の休息により超回復す

るが、運動後に高糖質食を摂取することで超回復が増強されることから (Sherman et al., 1981; Costill, 1988; Pitsiladis et al., 1999; Shinohara et al., 2010)、運動と高糖質食が GL の重要な要素とされている。試合やレースの約 1 週間前から、GL の基盤となる筋グリコーゲン超回復を誘導する激しい運動に加え、更なる運動と休養、そして高糖質食を調整することで、試合当日の筋グリコーゲン量を最大化し持久性能を向上させるコンディショニング法が GL である (Shinohara et al., 2010)。

興味深いことに、グリコーゲンは脳にも存在し、神経機能を支えるグリア細胞の一種・アストロサイトに貯蔵され (Tsacopoulos et al., 1996; Pellerin et al., 2012)、GL の基盤となる激運動後のグリコーゲン超回復が筋同様に誘導されることから (Matsui et al., 2012)、脳でも GL が奏功する可能性がある。アストロサイトのグリコーゲンは、神経活動に応じてニューロンのエネルギー源となる乳酸に分解され、アストロサイトからニューロンへの乳酸輸送が脳機能を担保する「アストロサイト-ニューロン乳酸シャトル」に寄与することが知られる (Tsacopoulos et al., 1996; Pellerin et al., 2012)。実際、脳グリコーゲン利用の薬理的阻害により持久能力や学習・認知機能が低下すること (Duran et al., 2013; Matsui et al., 2017)や、記憶を司る海馬のグリコーゲン利用を薬理的・遺伝的に阻害することで海馬が担う長期記憶が阻害されることから (Newman et al., 2011; Suzuki et al., 2011)、海馬グリコーゲンは記憶形成において重要な役割を担うことが明らかとなってきた。さらに、海馬可塑性を高める 4 週間の中強度運動トレーニングモデルは安静時の海馬グリコーゲン量を増加させることや (Matsui et al., 2012)、脳グリコーゲン

量を薬理的に増加させることで神経活動時間が延長することから (Suh et al., 2007)、脳グリコーゲン代謝からみた認知機能を向上させるコンディショニング法開発の実現可能が想定される。

以上のことから、本研究では GL が海馬を標的とした認知機能を高めるコンディショニングになりうるかどうかを明らかにすることを目的とした。これを検証するために、まず、GL のラットモデルの確立と脳への効果を検証するために GL が脳グリコーゲン量に及ぼす影響を検討した (研究課題 1)。次に、海馬 GL の開発にむけて、海馬を標的としたよりシンプルな GL 条件を探索するために、GL の 2 大要素である運動 (疲労困憊運動に加え、更なる運動と休養) と高糖質食の観点から海馬グリコーゲン量を増加させる最適条件を検討した (研究課題 2)。最後に、海馬 GL が認知機能へ及ぼす効果を新たに確立した行動神経科学的手法を用いて検討した (研究課題 3)。



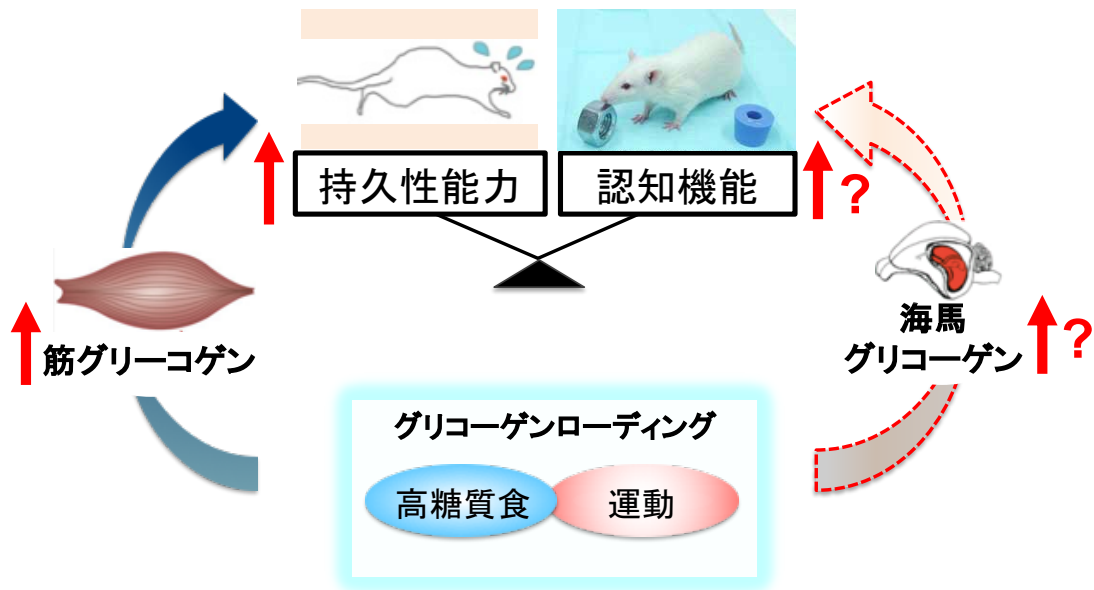


図 1 本研究の仮説図

高糖質食と運動から構成される GL は、筋グリコーゲン量を増加させることで持久性能力を向上させるコンディショニング法である。本研究では、GL が海馬を標的とした認知機能を高めるコンディショニングになりうるかどうかを明らかにする。

## 第2章 先行研究

### 1. 末梢組織の貯蔵糖質：グリコーゲン

#### 1-1. 筋および肝グリコーゲン

グリコーゲンは動物がその体内に有する貯蔵型の糖質であり、グルコースが $\alpha$ 1-4結合で直列に、 $\alpha$ 1-6結合で分岐的に連なった重合体である。グリコーゲンの主な貯蔵部位として肝臓（6%）と筋（0.7%）があり、それぞれの絶対貯蔵量は100gと400g程度とされている（筋は肝臓と比べ組織量が多く、貯蔵量が3~4倍多い）。

#### 1-2. 筋グリコーゲン分解・ATP合成

筋に貯蔵されるグリコーゲンは、運動による骨格筋収縮のためにATPを産生するエネルギー源である。肝臓とは異なり筋はグリコーゲンからグルコースへの生成を触媒するグルコース-6-ホスファターゼを持たないため、グリコーゲンは筋でしか利用できない。

ATPは筋の恒常性維持や筋収縮に必要な唯一のエネルギーであるが、筋内に貯蔵できるATP量は少なく、数十秒の筋活動しか保証しない。長時間の筋活動にはATPの再合成が不可欠となる。ATP再合成機構には無酸素性及び有酸素性の二大代謝系が存在する。これらの寄与は運動の強度や時間で異なるが、強度が高いほど無酸素性代謝系、一方、強度が低く、運動時間が長いほど有酸素性代謝系への依存度が増す。このうち、グリコーゲン代謝は無酸素性代謝における解糖系を経て行われるが、実際に酸素を使わずエ

エネルギーを産生する無酸素性解糖系と、酸素を使いエネルギーを産生する有酸素性解糖系が存在する。前者では貯蔵グリコーゲンまたは血中から取り込んだグルコースをピルビン酸および乳酸へと分解が進む。グリコーゲンはアドレナリンの刺激を受け、ホスホリラーゼによって G-1-P へと分解され、その後 G-6-P、ピルビン酸へと反応がすすみ、乳酸脱水素酵素の働きによってピルビン酸から乳酸へと還元される。この段階では ATP 産生はごく僅かである。一方、後者では、無酸素性解糖系を経て産生されたピルビン酸が酸素を用いたクエン酸回路で代謝され、大量の ATP を産生する。筋グリコーゲンおよび血中グルコースはここでようやく筋収縮のエネルギー源となる ATP を作り出すことができる。

### 1-3. 肝グリコーゲン分解・ATP 合成

肝臓のグリコーゲン(肝グリコーゲン)は代謝による血中へのグルコース放出により、食事間や低血糖時の血糖値の維持に寄与する点で重要である。肝臓がグルコースを放出する過程は大きく分けて2つの経路、1) 肝グリコーゲンの分解(糖原分解、glycogenolysis)による系路と、2) 糖でない物質からグルコースを合成する系路(糖新生、gluconeogenesis)を介して行われる。

肝グリコーゲン分解は、空腹時に分泌されたグルカゴンやストレス時に血中に放出されるアドレナリンなどにより刺激され、グリコーゲンホスホリラーゼ(glycogen phosphorylase、グリコーゲンを分解する酵素)の触媒によって生じる。肝臓のグリコーゲンホスホリラーゼは活性型(ホスホリラーゼ $\alpha$ )と不活性型(ホスホリラーゼ $\beta$ )があり、ホスファターゼであるプロ

テインホスファターゼ-1 が働くと不活性型になる一方、ATP とホスホリラーゼキナーゼの働きによって活性型になるなどして、グリコーゲン分解の阻害や促進が行われる。ホスホリラーゼはグリコーゲンの 1-4 結合を加リン酸分解することで、グリコーゲンから G-6-P を生成する。また、グリコーゲンの 1-6 結合はアミロ-1-6-グルコシダーゼ（脱分岐酵素）の加水分解による特異的な切断が必要である。これらの酵素とホスホリラーゼが共に働くことではじめてグリコーゲンは完全に分解される。グリコーゲン分解によって生成された G-1-P は G-6-P に変換され、肝臓と腎臓にのみ存在するグルコース-6-ホスファターゼの触媒作用により、G-6-P を脱リン酸化することでグルコースが生成される。

糖新生は、食物から十分な糖質が得られない時、乳酸や糖原生アミノ酸、グリセロールなどからグルコースを生成する系路である。グルコースは脳の神経細胞や赤血球にとり必要不可欠なエネルギー源であり、極度の低血糖は昏睡や死を招くことから糖新生は重要な血糖調節機構である。糖新生には、1) 乳酸からグルコースをつくるコリ回路と、2) 糖原生アミノ酸からグルコースを生成するグルコース-アラニン回路の 2 つの系路がある。コリ回路は、骨格筋や赤血球でグルコースが酸化されて生じる乳酸を肝臓に運び、ピルビン酸に変換した後、解糖系を G-6-P まで逆行し、最終的にグルコース-6-ホスファターゼの触媒によってグルコースを生成する。一方、グルコース-アラニン回路は、筋で解糖の途中に生じるピルビン酸をアミノ基転移によってアラニンを生成し、肝臓へ運ばれたアラニンからアミノ基を取り除くことでピルビン酸に変換し、最終的にはコリ回路と同様の系路

を経てグルコースを生成する。

#### 1-4. 筋および肝グリコーゲン合成

肝臓および筋におけるグリコーゲン合成の第1段階は血中グルコースの細胞内への取り込みである。骨格筋のグルコース取り込みはグルコース輸送単体4 (GLUT4) を介して行われる。GLUT4 は通常、細胞質内に存在するが、インスリンが細胞膜上の受容体に結合することで細胞質内から膜状へと移行 (トランスロケーション) し、グルコースを細胞内へと取り込む。また、この GLUT4 のトランスロケーションは筋収縮に伴う AMPK (AMP activated protein kinase) の刺激によっても生じる。インスリンと AMPK による GLUT4 のトランスロケーションは異なる情報伝達経路を介することが知られている (Hayashi et al., 1997)。

第2段階は、細胞内に取り込んだグルコースから G-6-P への変換である。この反応は肝臓ではグルコキナーゼ、筋ではヘキソキナーゼの触媒を介して行われる。続く反応で、G-6-P はホスホグルコムターゼの触媒反応により G-1-P に転換され、G-1-P は UDPGlc ピロホスホリラーゼの触媒によりウリジン二リン酸グルコースとなる。その後、ウリジン二リン酸グルコースはグリコーゲン合成酵素の作用によって、グリコーゲン末端のグルコース残基 C-4 との間にグリコシド結合をつくり、側鎖を伸長していく。また、グリコーゲン合成の第2の酵素である分岐酵素がグリコーゲンに働くことで、1-4 結合に分岐するかたちで新たなグルコース残基をつけ (1-6 結合)、分岐した後は 1-4 結合により分岐鎖をさらに伸長し、グリコーゲン分子を大きく

する。

また、グリコーゲン合成酵素（グリコゲンシンターゼ：GS）およびグリコーゲン分解酵素（グリコゲンホスホリラーゼ：GP）は、基質によるアロステリック調節やホルモンによる調節を受けており、cAMP 依存性プロテインキナーゼの働きによりそれらの活性は変化する。細胞内 cAMP 濃度はアドレナリンやグルカゴン刺激によって ATP から合成されて上昇し、そのシグナルが cAMP プロテインキナーゼを活性化することでグリコーゲン分解を促進・グリコーゲン合成は抑制される。逆に、グリコーゲン分解が止まると、グリコーゲン合成がこれに連動して促進される。その他にも、GS は細胞内で増加した G-6-P によってもアロステリックに活性化されるため、糖取り込みの促進による細胞内 G-6-P の上昇によってグリコーゲン合成は促進される（Hayashi *et al.*, 1998）。

#### 1-5. 運動後の筋グリコーゲン超回復

運動後に減少した筋グリコーゲンは、運動前のレベルまで回復した後、さらに増加する（超回復）。Yakovlev によると、超回復の種類は運動の強度に依存しており、適切な強度で運動を負荷した時に超回復は最も高まり、運動強度が高すぎる場合は小さく、低すぎる場合には起こらない（Yakovlev NN, 1995）。すなわち、自らの運動能力に見合う、適切な運動強度の設定が重要であり、これは「過負荷（overload）の法則」とも合致する。この超回復現象は、1941 年ソ連の Folbrot によって発見され、ストレス学説を唱えた H. Selye は「超回復」が汎適応症候群にあたり、ストレスに対する生体の

全身適応反応だと述べた。その後、ソ連の Yakovlev は超回復が起こるサイクルを4つのステージ（①運動時、②運動後の回復期、③超回復期、④退行期（アスリートが超回復期に新たな刺激を与えなかった場合に生じる））に分類し考察した。また、Price らは (Price et al., 1994)、運動後の筋グリコーゲン再合成の過程を2つのステージ（①急速期、②緩徐期）に分類した。ここでは、超回復のメカニズムの急速期、緩徐期の2つに分けて述べる。

#### 1-5-1. 筋グリコーゲン再合成の急速期

運動直後から1時間程度の筋グリコーゲン再合成は急速に行われる。この背景には、AMPK を介した細胞内への糖取り込み増加によるものと、グリコーゲン合成速度が高まることによるものが2つ、要因として存在することが知られている。

AMPK による運動後の糖取り込み促進は、運動時の糖取り込み能向上の残存効果である。運動は筋収縮時に大量の ATP を消費する。この時、ATP は  $ATP \rightarrow ADP \rightarrow AMP$  へと分解され、細胞内エネルギー低下のシグナルである AMP 濃度が細胞内で高まると AMPK (AMP activated protein kinase) が活性化し、細胞質中の GLUT4 をインスリン非依存的に膜状へ移行させ、細胞内へグルコースを取り込む。AMPK は AMP によってアロステリックに活性化される。運動後1時間程度はこの系路による GLUT4 のトランスロケーションが持続するため、筋への糖取り込みが増す。

2つ目のグリコーゲン合成速度の増大は、アロステリック調節を受けるグリコーゲン合成酵素 (GS) の活性が高まることによる。グリコーゲンの

分解と合成は可逆的な関係性にあるため、運動後の筋グリコーゲン枯渇がグリコーゲン分解抑制シグナルとなって、GS 活性が高まり、グリコーゲン再合成が促進される。運動後の GLUT4 による糖取り込み促進の結果、細胞内に流入したグルコースはヘキソキナーゼによる触媒作用を経てリン酸化され G-6-P となり、さらに G-1-P、UDPG へと変換され、最終的にグリコーゲン顆粒へ付加されるが、このとき、GS は UDPG をグリコーゲンのグルコース末端へ付加し、グリコーゲン分子を大きくする役割を担っている。さらに、GS は G-6-P 上昇によってアロステリックに活性化されるため、GLUT4 による糖取り込み促進でグルコースから変換された G-6-P が細胞内で増加することによってもグリコーゲン合成が促進される (Shulman et al., 1995; Ivy et al., 1998)。

しかし、GS の脱リン酸化による活性化はグリコーゲン濃度の回復とともに運動前の安静レベルに戻ってしまうため、以上の2つの系路は主に、運動後の回復期におけるグリコーゲン再合成に寄与している。

#### 1-5-2. 筋グリコーゲン再合成緩徐期

運動後に減少した筋グリコーゲンレベルが超回復するには、インスリン感受性の向上による糖取り込み促進作用が必須である。運動終了から1時間以上が経過すると、筋収縮に伴った AMPK による糖取り込み促進作用は安静時レベルにまで回復する。しかし、運動後にインスリン感受性が向上することによって、同濃度のインスリンに対する GLUT4 の反応性が高まり、より多くの GLUT4 が細胞膜上へ移行し、糖取り込みが促進され (Hansen et



al., 1998)、グリコーゲン超回復が起こる。このインスリン感受性の向上は筋グリコーゲンが超回復した後にその感受性が低下（安静時レベルに戻る）するため、このタイミングのずれによって超回復が生じている。

## 2. グリコーゲンローディング

グリコーゲンローディングはアスリートの持久性パフォーマンスを向上させるために Astrand (Astrand, 1967)によって提案されたコンディショニング法である。1960年代にイギリスの Ronald Hill がフルマラソン前の調整期に初めて導入し、見事優勝を飾ったことで注目を集めるようになった。グリコーゲンローディングが開発されるきっかけとなった研究は2つある。1つは Christensen & Hansen が (Christensen et al., 1939)運動と食事に関する研究の中で、高糖質食を摂取した群は高脂肪食を摂取した群に比べ、持久性運動時間を延長させ、運動時の糖質の重要性を初めて説いたものであり、その後多くの持久性運動能力、筋グリコーゲンや糖質に関する研究が盛んに行われるきっかけとなった。もう1つは Bergström & Hultman (Bergström et al., 1966)による運動後の筋グリコーゲン超回復に関する研究である。彼らは運動によって枯渇する筋グリコーゲンは、その後の糖質摂取と休息によって元のレベルよりも増加することを初めて示した。これら2つの知見が基盤となって、グリコーゲンローディングは開発された。

グリコーゲンローディングは試合前約1週間で運動量と食事内容を調整することで、筋グリコーゲン貯蔵量を増加させ、持久性パフォーマンスを高めることを目的としている。グリコーゲンローディングにおける運動と食

事を組み合わせた調整方法は大きく分けて2つあり、1つは「古典的グリコーゲンローディング法」と呼ばれるもの、もう1つは1980年代に Sherman ら (Sherman et al., 1981)が発表した現実的なグリコーゲンローディング法である。古典的グリコーゲンローディング法は初日に激しい運動を行い、筋グリコーゲン量を枯渇させる。その後3日間の食事では低糖質食（高タンパク質＋高脂肪食）を摂ることでさらに筋グリコーゲンを枯渇させる。その後再び中強度の運動を行い、それ以降3日間の食事を高糖質食に切り替えることで筋グリコーゲン貯蔵を高めるというものである。しかし、この方法は身体への負担が大きく、試合前のコンディショニングとしてはふさわしくない症状が報告される（①低血糖によるモチベーションの低下、②急激な食事の変化による下痢や腹痛、③1週間にわたる困難な食事制限）。そこで新たに考案されたものが Sherman らによるグリコーゲンローディング法である。これも1週間程度の期間を要することは古典的グリコーゲンローディング法と同じだが、筋グリコーゲンを枯渇させるような激しい運動と厳しい食餌制限を行わないのが大きな違いである。この1週間の古典的グリコーゲンローディングのラットモデルを Shinoraha ら (Shinohara et al., 2010) が確立し、激しい運動とその後の運動に加え1週間の高糖質食摂取する群（HCD）、またはHCDと同様の運動と1週間の前半は低糖質食、後半は高糖質食を摂取する群（GL）において、グリコーゲンローディングにより両群ともに筋グリコーゲン量が有意に増加することを明らかにした。一方、現実的なグリコーゲンローディング法では、運動は試合当日に向けて徐々に運動量（またはトレーニングの質）を落としていくテーパリングを行

い、前半3日間は普段と変わらない食事を取り、後半3日間を高糖質食に切り替える。どちらのグリコーゲンローディングでも同量の筋グリコーゲンが貯蔵されることから、現在は後者のグリコーゲンローディング法がアスリートの間では主流となっている。

### 3. 脳のグリコーゲン代謝

#### 3-1. 脳におけるグリコーゲンの存在

グリコーゲンは脳にも存在する。ヒトの脳には体重当たり約 0.5~1.5 g (0.1 %)のグリコーゲンが貯蔵されており、その貯蔵量は肝臓や筋に比べるとごく僅か(脳:筋:肝 = 1:10:100) (Nelson et al., 1968)であることから、脳グリコーゲンの存在は軽視されてきた。しかし、脳内に存在するグリコーゲンの多くがアストロサイト内に局在することや (Cataldo et al., 1986)、脳におけるアストロサイトの割合は神経の約 10 倍と圧倒的に多く、同士の接続部であるシナプス密度が高い付近のアストロサイトに存在 (Koizumi et al., 1970b, 1970a; Phelps, 1972)、グリコーゲン分解酵素 (Ignacio et al., 1990)およびグリコーゲン合成酵素 (Inoue et al., 1988; Pellegrini et al., 1996)も有することから、アストロサイト内のグリコーゲンは神経活動との関連があるとも考えられるようになった。

#### 3-2. 解糖系

脳はニューロン、アストロサイト、毛細血管から構成されており、アストロサイトは貯蔵するグリコーゲンを乳酸へと分解し、グルコースに代わるエネルギー基質としてニューロンへ供給する。このアストロサイトとニュー

ーロン間の乳酸を介した代謝連関は、アストロサイト-ニューロン乳酸シャトル (ANLS) と言われ、1994年に Pellerin & Magistretti らにより初めて提案された (Pellerin et al., 1994)。アストロサイトは神経活動亢進に伴い放出される神経伝達物質であるグルタミン酸と  $\text{Na}^+$  を細胞内へ共輸送し、細胞内  $\text{Na}^+$  の増加が  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase 上昇による PGK (phosphoglycerate kinase) を活性化させることで、アストロサイト内で解糖系を介して血中由来のグルコースから乳酸を生成する。その際、各組織間のグルコースおよび乳酸輸送は、細胞膜上に存在する乳酸輸送単体(MCT: monocarboxylate transporters) を介して行われる。MCT1は血管内皮細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトに発現する。MCT2はニューロン特異的に発現し、樹状突起および軸索のどちらにも発現が見られるが、主に樹状突起に多く発現が認められる (Bergersen et al., 2001; Pierre et al., 2002)。MCT4はアストロサイトにのみ発現する。

### 3-3. 脳グリコーゲン分解・合成

ANLSでは、アストロサイトからニューロンへの乳酸輸送は、アストロサイトのグリコーゲン由来の乳酸輸送系路も想定されている。すなわち、アストロサイトでは解糖だけでなく、グリコーゲン分解も行われていることになる。脳におけるグリコーゲンは一部、脳や末梢神経の大きな神経に存在が確認されているが (Sotelo et al., 1968)、ニューロンでは永久的にグリコーゲン合成酵素が分解されることや (Vilchez et al., 2007)、グリコーゲンがニューロンに蓄積すると細胞死が起こることから、現在では生理的な役割

を果たす脳グリコーゲンにはアストロサイトに局在すると考えられている。

グリコーゲン分解を促進する神経伝達物質または神経修飾物質は現在のところ、ノルアドレナリン (NA)、VIP (vasoactive intestinal peptide)、セロトニン、アデノシン、ATP が想定されており、解糖を促すグルタミン酸はこれに入らない (Magistretti et al., 1988; Sorg et al., 1992; Petit et al., 2015)。先行研究では、グリコーゲン分解は神経活動亢進に伴うエネルギー需要増大時に乳酸をニューロンに供給するだけでなく、アストロサイト内の乳酸は神経の軸索における活動電位の維持にも利用されているという報告がある (Brown et al., 2003, 2007)。

また、マウスの皮質でグリコーゲン分解を促進する VIP および NA は、グリコーゲン合成にも関与することがマウスの皮質アストロサイト培養細胞内で確認された (Sorg et al., 1992)。NA はアストロサイトに存在する NA  $\beta$  受容体に、VIP は VIP の受容体に結合した後、数分間は細胞内 cAMP を上昇させることでグリコーゲン分解を促し、その後 2～3 時間後からグリコーゲン標的タンパク質 (PTG) の合成を高めることでグリコーゲン合成を促進する。

また、アストロサイトは貯蔵するグリコーゲンを低血糖時や神経活動に伴うエネルギー需要増大時により乳酸へ分解し、エネルギー基質としてニューロンへ乳酸を供給する (Swanson & Choi, 1993; Wender et al., 2000; Brown, 2003)。脳は血中のグルコースのみをエネルギー源として利用することがこれまでの定説であったが (Stryer, 1995; Frier & Fisher, 1999, Garrett & Grisham, 1999)、グルコースのみならず脳グリコーゲン由来の乳酸もエネルギー

ギー基質として利用することが明らかとなった。

### 3-4. 運動時の脳グリコーゲン代謝

グリコーゲンは筋や肝臓だけでなく、脳のアストロサイトにも存在する (Wender *et al.*, 2000)。脳のグリコーゲンは神経活動の亢進や血液由来のグルコース供給不足 (低血糖) によって減少し、その後再補充される (Brown, 2004)。運動時、脳は筋と同様に活性化し、脳のエネルギーや酸素需要の増加や (Nybo & Secher, 2004)、ニューロンを活性化することが報告されている (Vissing *et al.*, 1996; Saito & Soya, 2004; Nishijima & Soya, 2006; Ohiwa *et al.*, 2006; Soya *et al.*, 2007a; Soya *et al.*, 2007b; Nishijima *et al.*, 2011b)。さらに、低血糖を引き起こす長時間運動は (Tabata *et al.*, 1984)、筋同様に、運動に関わる脳5部位 (皮質、海馬、視床下部、小脳、脳幹) のグリコーゲンを減少させ、その後超回復することが明らかとなっている (Matsui *et al.*, 2011, 2012)。脳グリコーゲンの減少は、筋グリコーゲンが運動時間依存的に減少するのに対し (Gollnick *et al.*, 1974)、脳グリコーゲンは運動開始 120 分の時点 (30, 60 分時には減少が見られない) でのみ生じることから、運動終盤での低血糖が脳グリコーゲンを減少させる決定因子である可能性を示唆している。また、脳グリコーゲンの減少と脳内で増加した乳酸との間に負の相関関係があったことから、長時間運動時に脳グリコーゲンが乳酸に分解されたことを示している。これは、“アストロサイト-ニューロン乳酸シャトル (Pellerin & Magistretti, 1994)” のように、長時間運動時にアストロサイトのグリコーゲンが分解され、ニューロンのエネルギー供給源として乳酸を供

給している可能性を示唆する (Matsui et al., 2011)。

また、運動時の脳グリコーゲン分解には NA およびセロトニンが関与している可能性が示唆されている。NA およびセロトニンは運動時に脳内で増加することや (Newsholme *et al.*, 1992; Pagliari & Peyrin, 1995)、これらの代謝産物である MHPG と 5-HIAA は長時間運動後の脳グリコーゲン減少との間に負の相関が見られることから、運動時にはこれらがグリコーゲン分解に関与している可能性がある。

### 3-5. 脳グリコーゲンの生理的意義

脳グリコーゲンの生理的意義は未だ不明であるが、いくつかの先行研究で記憶との関連が示唆されている。脳グリコーゲンが記憶形成に関連していることを初めて示したのは、Gibbs *et al.*, (1994) による日齢ヒヨコを用いた研究である。彼らはヒヨコが苦味を嫌う習性を持つことから、色の異なるビーズの一方に苦味を付加することで、ビーズの色と味 (にがみ) を関連づけて記憶させる弁別学習課題を課した。この課題は、初めに 2 色のビーズのうち一つ (青とする) に苦味をつけておき、2 つのビーズを同時にヒヨコに与え、ヒヨコに苦味のつくビーズの色を覚えさせる。その後、青いビーズを苦味の無いものに取り替え、再度ヒヨコに 2 色のビーズを同時に提示し、ヒヨコが苦味のついていた青色のビーズを避けるかどうかで、記憶の保持ができているかどうかを評価する。この時、ヒヨコの前頭皮質のグリコーゲン濃度を課題前と課題後 65 分まで測定したところ、グリコーゲン濃度は弁別学習課題提示直後に変化は見られなかったものの、課題提示 35 分

後から 55 分までの間で経時的に有意な減少が見られた。これらの結果から、グリコーゲン は学習後 20～50 分の間 の記憶形成に重要であることが示された。また、学習後の記憶形成過程を短期間、中期間、長期間に分類したとき、グリコーゲンは中期間 (30～50 分) の記憶形成時に重要であり、グリコーゲン分解および解糖系による代謝過程はその後の長期記憶にも必要不可欠であることが示唆された。

また、Suzuki *et al.*, (2011)によると、脳グリコーゲンはラットの長期記憶形成にも関与しており、アストロサイトからニューロンへの乳酸輸送が重要な役割を担っていることを報告した。この実験は、ラットに抑制性回避テストを課し、課題後 24 時間 (短期記憶) と 6 日後 (長期記憶) の嫌悪記憶保持に脳グリコーゲンが関与するかどうかを検討したものである。脳グリコーゲン利用が記憶形成に関与するかどうかを検討するために、アストロサイト内のグリコーゲン分解を阻害する DAB を記憶に関連する脳部位である海馬の両側の背側部に投与し、ニューロンへのアストロサイト由来の乳酸供給が重要であることを示すために、ニューロンに存在する乳酸トランスポーターの MCT2 を欠損させた。海馬アストロサイト内のグリコーゲン分解阻害およびニューロンの乳酸取り込み阻害は短期記憶に影響を及ぼさないが、長期記憶の成績を低下させたことから、海馬のグリコーゲンは長期記憶形成に重要であることが示唆されている。

### 3-6. 運動が高める海馬機能

運動が認知機能向上効果を有することは広く知られるようになり、その



効果は健常なヒト、高齢者、疾患患者や動物実験において多数報告されている。“運動”と一口に言っても、運動の期間、様式や強度など様々な条件があり、それらの条件によって身体機能や認知機能への効果が異なることから目的に応じて適切に行うことが重要である。実際に、アメリカスポーツ医学会が「Exercise is medicine」と掲げるように、運動は適切に行うことで薬と同等またはそれ以上の効果を発揮することは臨床現場でも少しずつ認められるようになり、先進的な病院では生活習慣病のみならず (Stewart et al., 2005)、認知症患者に対しても運動療法が用いられているという (Erickson et al., 2011; Hoffmann et al., 2016)。このような運動は、認知機能のなかでも学習・記憶を担う海馬に及ぼす影響が大きいことから、運動が海馬機能に及ぼす効果について盛んに研究が行われている。

### 3-6-1. 海馬の構造

海馬は大脳辺縁系を構成する脳部位の一つであり、解剖学的にアンモン角 (CA, Cornu Ammonis)、歯状回 (DG, dentate gyrus)、海馬台 (subiculum) を合わせて海馬体 (hippocampal formation) という。海馬の細胞の特徴として、CA 領域は錐体細胞 (pyramidal cell) が存在し、細胞の大きさから CA1-CA4 の 4 領域に分類されている。一方、DG は顆粒細胞 (granule cell) が存在し、生涯にわたり新たな神経細胞が産生される (成体海馬神経新生) (Eriksson et al., 1998)。海馬における情報伝達は、はじめに嗅内皮質 (perforant path) から DG が信号を受け取り、苔状線維 (mossy fiber) を介して CA3 に伝達され、CA3 はシェーファー側枝 (Schaffer collaterals) を通

じて CA1、そして最終的に大脳皮質へと信号を送る。

### 3-6-2. 海馬の機能

海馬は記憶を司る脳領域として知られており、主に長期記憶や空間記憶を担うことがヒトや動物実験から明らかになっている。人工的な海馬切除は新しい出来事を記憶することができない「順行性健忘」を呈することや (Squire, 2009)、アルツハイマー型認知症や神経変性疾患による海馬萎縮に伴い記憶能が低下すること (Petersen et al., 2000; Van Petten, 2004)、動物実験では海馬の病変により空間記憶成績が低下することがモリス水迷路や放射状迷路テストを用いて明らかにされてきた (Morris, 1984; McDonald et al., 1993)。特に、海馬のニューロンの多くは場所細胞 (place cell) であり、固有の位置情報に対してのみ発火するニューロンを有する (O'Keefe J, 1971)。また、これら以外に海馬は“似ている情報を別のものとして識別し記憶する機能”であるパターン分離能を担うことが、近年ヒトの fMRI 研究により明らかになった (Yassa et al., 2011a)。海馬のなかでも DG および CA3 がこの機能に貢献しており (Yassa et al., 2011b; Reagh et al., 2014)、その神経基盤として神経新生の関与が明らかになっている (Burghardt et al., 2011)。

### 3-6-3. 運動による海馬機能向上効果

これまで、齧歯類で運動が海馬機能に及ぼす効果を検討した先行研究は、飼育ケージ内での運動量や自発的な輪回しケージを用いたものだったが (van Praag et al., 1999)、運動は強度によってストレス反応が異なることから

(Ohiwa et al., 2007)、運動が海馬機能に及ぼす効果を検討する際これらを考慮する必要がある。ストレス反応が生じない低強度運動は中強度運動と同等に海馬を活性化させるだけでなく (Soya et al., 2007)、低強度運動トレーニングは海馬神経新生を促進し (Okamoto et al., 2012)、空間認知機能を高めることが明らかとなっている (Inoue et al., 2014)。この低強度運動トレーニングの効果はストレス反応を伴う高強度運動トレーニングでは見られなかったが、適度な負荷は海馬神経新生を促進し、空間認知機能を高めることが負荷付き輪回しケージを用いた研究から明らかとなっていることから (Lee et al., 2012)、海馬機能を高めるための運動強度、期間および様式を検討することの重要性が示唆される。さらに、認知機能の低下が見られる 2 型糖尿病動物でも運動トレーニングによって低下した空間認知機能が改善することが報告されている (Shima et al., 2016)。この時、2 型糖尿病動物ではアストロサイトからニューロンへグリコーゲン由来の乳酸輸送を担う MCT2 の発現量が海馬で低下しており、これが運動トレーニングにより改善することが認知機能向上の背景にあるメカニズムであることも明らかにしている (Shima et al., 2016)。このように、運動が海馬機能を高める背景として神経新生や海馬内糖代謝が関与することが明らかになってきたが、これらの関係性については未だ不明であり今後の研究が待たれる。

近年、ヒトにおいても一過性運動により海馬が担う記憶能が向上することが明らかとなった (Suwabe et al., 2017b)。これまで、ヒトの認知機能に対する運動効果を検討した研究では、一過性低強度および中強度運動で前頭前野が担う実行機能が向上することが明らかとなっていたが (Yanagisawa

et al., 2010; Byun et al., 2014)、海馬特異的な機能であるパターン分離能を評価する認知課題を用いることで (Yassa et al., 2011)、一過性中強度運動によりパターン分離能が向上することが証明され (Suwabe et al., 2017b)、その機能は持久力と相関関係があることが明らかとなった (Suwabe et al., 2017a)。パターン分離能とは、海馬のなかでも CA1 や DG が担う海馬特異的な記憶能であり、似て非なるものを識別する能力を指す。近年、遺伝子改変動物や新たに開発された行動実験装置を用いることで、マウスにおけるパターン分離能とその脳内神経メカニズムの解析が急速に進んでいる (Clelland et al., 2009; Sahay et al., 2011)。ヒトにおいても、パターン分離能を評価する認知課題テストが確立され、課題中の脳活動評価に fMRI を用いることで動物と共通の脳内機構も明らかにされつつあり (Yassa et al., 2011b; Berron et al., 2016)、海馬が担う記憶能の一つとして注目を集めている。これらのように、用いる認知課題により評価が可能となる脳部位は異なることを利用した動物実験でも、物体記憶や物体の空間記憶能から皮質や海馬の機能の評価する新奇物体再認テスト (NOR) または新奇物体位置再認テストを用い、物体の類似度や移動距離を調整することで認知課題の難易度を設定し、海馬特異的な機能であるパターン分離能の評価に成功しただけでなく (Bolz et al., 2015; van Hagen et al., 2015)、運動効果の評価に有用であることも明らかとなった (Bolz et al., 2015)。これまで、ラットやマウスの海馬機能評価には多くの場合モリス水迷路 (MWM) が用いられてきたが、齧歯類にとって游泳運動は情動的なストレスとなり海馬のみならず扁桃体も活性化することが報告されていることから (Akirav et al., 2002)、ラットの自発的な行動により海馬特

的な機能を評価することができる NOR は、MWM 同様に運動による海馬機能向上効果の評価に有用であると考えられる。しかし、NOR を用いてパターン分離能を評価する高難易度課題はラットにおいて未だ確立されていない。多くの行動実験で求められる様々なストレス（食餌制限、電気ショック、游泳運動ストレス）や長いトレーニング期間を必要とせず、海馬機能を評価することができる行動実験の確立は、今後多くの運動実験における認知機能評価に有用であり、ラットにおける高難易度課題の確立が求められる。

## 第3章 研究目的および課題

### 1. 研究目的

本研究では GL が海馬を標的とした認知機能を高めるコンディショニングになりうるかどうかを明らかにすることを目的とした。これを明らかにするために、GL の動物モデルを用いて、GL が脳グリコーゲン量に及ぼす影響を検討した（研究課題 1）。次に、海馬を標的とした海馬 GL の開発にむけて、GL の構成要素である高糖質食や運動の条件を調整し、海馬を標的としたよりシンプルな GL 条件の探索を行った（研究課題 2）。最後に、研究課題 2 で開発した海馬 GL が認知機能に及ぼす効果を検討した（研究課題 3）。

### 2. 研究課題

本研究の目的を達成するために、以下の研究課題を設定した。なお、各研究課題には複数の小課題を設定して実施した。

#### 【研究課題 1】 GL が脳グリコーゲン量に及ぼす影響

GL は筋グリコーゲン量を増加させ、持久性能を高める運動と高糖質食を組み合わせたコンディショニング法である。GL の基盤となる筋グリコーゲン超回復は脳でも生じることが報告されていることから、GL は筋同様に脳グリコーゲン量を増加させる可能性がある。したがって、本研究で用いる GL は持久性能を高め、筋のみならず脳グリコーゲン量を増加させるかどうかを明らかにする。

## 【研究課題 2】海馬を標的としたよりシンプルな GL 条件の探索

海馬は学習や記憶などの認知機能を司る脳部位であり、海馬に貯蔵されるグリコーゲン<sup>1</sup>は長期記憶の形成に関与し、長期間の運動トレーニングは海馬グリコーゲン量を増加させることで海馬機能を高めることが報告されている。GL の構成要素である高糖質食と運動の観点から、それらの条件を調整することにより、より短期間で効率的に海馬特異的にグリコーゲン量を増加させる海馬 GL の確立が可能かどうかを明らかにする。

### 研究課題 2-1: GL 期間中の海馬グリコーゲン動態の検討

GL により筋グリコーゲンは 1 週間で増加することが報告されているが、GL の基盤となるグリコーゲン超回復は筋が一過性運動後 24 時間で生じるのに対し、海馬では 6 時間後と早期に生じる。したがって、GL による海馬グリコーゲン量の変化も筋より早期に生じる可能性があるため、GL 開始後 5、6、7 日目のグリコーゲン量を測定し、海馬グリコーゲン量が最も増加するタイミングを明らかにする。

### 研究課題 2-2: GL における高糖質食が海馬グリコーゲン量に及ぼす影響

GL による海馬グリコーゲン量の増加に、GL の構成要素である高糖質食が必須かどうかを明らかにするために、糖質濃度の異なる食餌と運動（疲労困憊運動に加え、更なる運動と休養）を組み合わせた GL の影響を検討する。

### 研究課題 2-3: GL における運動が海馬グリコーゲン量に及ぼす影響

GL による海馬グリコーゲン量の増加に、GL の構成要素である運動（疲労困憊運動に加え、更なる運動と休養）が必須かどうかを明らかにするために、1 週間の高糖質食および運動を行う GL 群と、高糖質食と安静を課す非 GL 群の海馬グリコーゲン量を検討する。

### 研究課題 2-4: 海馬グリコーゲン量増加に必要な運動条件の検討

GL の運動は初日の疲労困憊運動（20m/min、疲労困憊に至るまで）と、続く 3 日間の中強度運動（20m/min、30m/day）と最後 3 日間の安静から構成される。したがって、これらの運動条件を組み合わせることで、海馬特異的にグリコーゲン量を増加させることができるかどうかを検討する。

### **【研究課題 3】海馬 GL がパターン分離能に及ぼす効果**

海馬に貯蔵されるグリコーゲンは長期記憶の形成に重要な役割を果たすことが報告されており、実際に、海馬のグリコーゲン量が増加する長期間の運動トレーニングでは、海馬が担う空間学習機能が高まることが明らかになっている。したがって、海馬 GL により海馬特異的にグリコーゲン量を増加させることで海馬が司る認知機能を高めるかどうかを検討する。しかし、海馬 GL 直後の海馬機能評価に適したラットの行動実験はこれまでにないため新たに確立する必要がある。海馬 GL の特性や脳グリコーゲンへの影響を考慮し、3 つの条件（①短期間で実施可能、②食餌制限や報酬は不要、③運動能力は影響しない）を満たした新奇物体再認テストが有用と考えられ



たが、この行動実験により海馬機能を評価するためには高難易度の課題を確立する必要があり、これにより海馬得意的な機能であるパターン分離能を評価できることがマウスを用いた研究で報告されている。したがって、本研究課題では海馬 GL が海馬の認知機能に及ぼす効果を検証するため、新奇物体再認テストを用いたラットにおける高難易度課題の確立を行い、それを用いて海馬 GL がパターン分離能に及ぼす効果を検討する。

#### 研究課題 3-1：新奇物体再認テストを用いてパターン分離能を評価する高難易度課題の確立

海馬 GL が認知機能に及ぼす効果を検証するために、短時間でできる行動実験である新奇物体再認テストを用いる。近年、新奇物体再認テストで用いる課題に難易度を設定することで、海馬特異的な機能である「パターン分離能」を評価できることが報告されており、本研究においても課題の難易度設定ができるかどうかを検討する。

#### 研究課題 3-2：海馬 GL が海馬の司るパターン分離能に及ぼす効果

海馬 GL が海馬特異的な認知機能を高めるかどうかを、新奇物体再認テストの低難易度課題と高難易度課題を用いて明らかにする。

## 第4章 GL が脳グリコーゲン量に及ぼす影響(研究課題1)

### 1. 目的

約1週間のGLは筋グリコーゲン量を増加させ、持久性を向上させる運動と高糖質食を組み合わせたコンディショニングである。GLの基盤となる疲労困憊運動後の筋グリコーゲン超回復は脳でも生じることが報告されていることから、GLが筋と同様に脳グリコーゲン量を増加させる可能性がある。研究課題1では、持久性を高めるGLが筋と同様に脳グリコーゲン量を増加させるかどうかを脳部位別に検討する。

### 2. 方法

#### 2-1. 被験動物および飼育

本研究は、筑波大学動物実験指針に基づき、動物実験倫理委員会の承認を得て行われた。実験には11週齢のWistar系雄ラット(250-300g、SLC、Japan)を用いた。飼育環境は室内温度  $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $60 \pm 10\%$  に設定し、7:00~19:00を明期とした明暗サイクルを維持した。予備飼育から走行学習期間の食餌は通常の動物用粉末飼料(通常食:糖質61%、脂質13%、タンパク質26%) (オリエンタル酵母、Japan)、飲料水は蒸留水をそれぞれ用い、ともに24時間自由摂取させた。

#### 2-2. 走行学習

ラットには1週間の予備飼育の後、小動物用トレッドミル(KN-73、夏目製作所、Japan)を用いて1日30分間の走行学習を6日間課した(表1)。この走行学習のプロトコルを行ったWistar系雄ラットのLTは、およそ15~20m/minであることが確認されている。

表 1 走行学習プロトコル

Day	Running speed and time
1	Rest+10min, 5m/min+10min, 10m/min+10min
2	5m/min+10min, 10m/min+10min, 15m/min+10min
3	Rest
4	10m/min+10min, 15m/min+10min, 20m/min+10min
5	15m/min+10min, 20m/min+10min, 25m/min+10min
6	15m/min+10min, 20m/min+10min, 25m/min+10min

### 2-3. GL

実験デザインを図2に示した。1週間の予備飼育の後、走行学習最終終了後2日間の安静をおき、Pre群のラットはマイクロ波照射により屠殺し、各種組織を採取した。Post群のラットには1週間のGLを課した。GLはSuzukiら(2010)のプロトコルを参考にした。GLは7日間の高糖質食(糖質含有量70%)と運動(1日目: 疲労困憊運動(20m/min, 疲労困憊に至るまで)、2-4日目: 中強度運動(20m/min, 30min/day)、5-7日目: 安静(30min/day(トレッドミル上で安静))から構成される。予備飼育および走行学習期間中は通常食の粉末飼料(糖質61%、脂質13%、タンパク質26%)を摂取させ、GL開始に伴い高糖質食(糖質70%、脂質5%、タンパク質25%)に切り替えた。疲労困憊運動時の疲労困憊の評価は、ラットを仰向けにしたときの起き上がり反射の有無で判断した(Hasegawa et al., 2008; Matsui et al., 2011, 2012, 2017)。

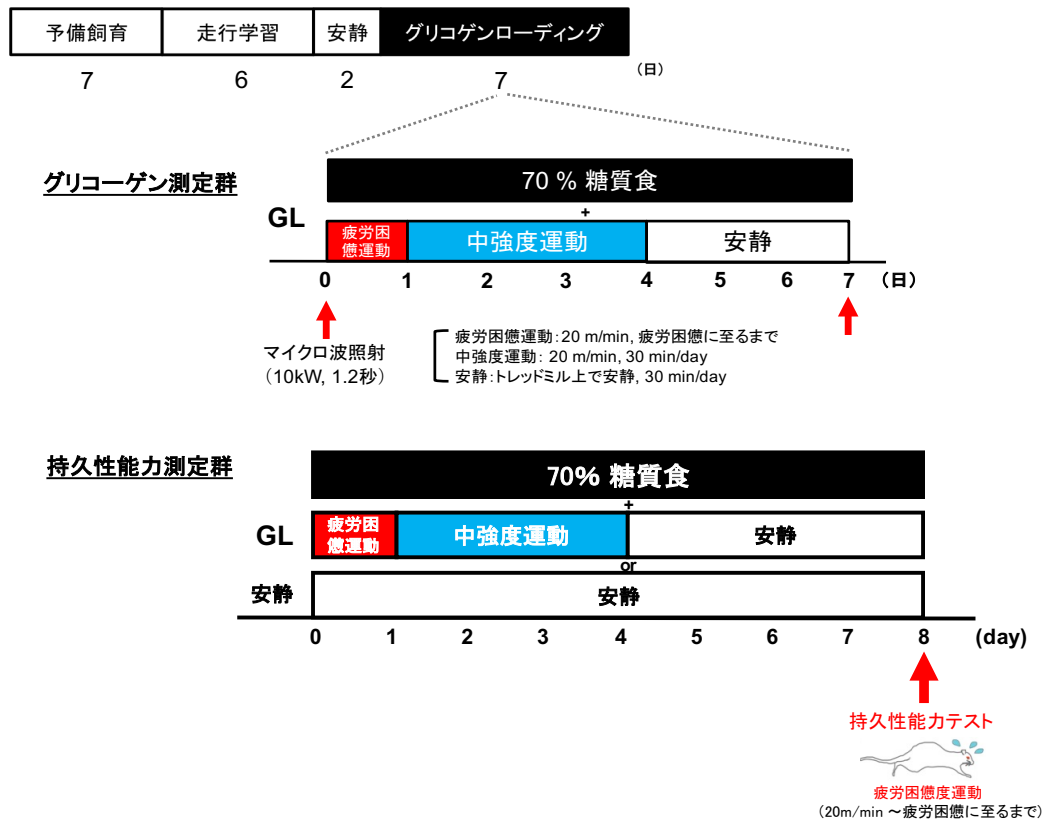


図 2 研究課題 1 実験デザイン

研究課題 1 の実験デザインを示した。通常食下で飼育中のラットに 6 日間の走行学習を課し、2 日間の安静を置いた後に 7 日間の GL を行った。GL では 70 %高糖質食を摂取させながら次の運動を行った；初日：疲労困憊運動（20 m/min, 疲労困憊に至るまで），2-4 日目：中強度運動（20 m/min, 30 min/day），5-7 日目：安静。グリコーゲン測定群は Pre-GL および Post-GL 群のラットをマイクロ波照射（10kW）によって屠殺し、筋、肝臓、脳を採取した。持久性能力測定群は高糖質食摂取と運動を行う GL 群または高糖質食摂取と安静を課す安静群に群分けし、GL 後の持久性能力を測定した。

#### 2-4. 持久性能力測定

持久性能力測定群のラットは予備飼育、走行学習および2日間の安静を置いた後に70%の高糖質食を摂取と運動（1日目：疲労困憊運動（20m/min, 疲労困憊に至るまで）、2-4日目：中強度運動（20m/min, 30min/day）、5-7日目：安静（30min/day（トレッドミル上で安静））を行うGL群または安静をとらせる安静群に群分けした（図2）。研究課題3でGL後に認知機能測定を行うことを想定し、持久性能力テストは疲労困憊運動をGL開始後8日目に実施した。持久性能力の評価はGL後の疲労困憊運動時間を安静群とGL群で比較した。また、同一個体におけるGL前後の持久性能力の比較はGL初日の疲労困憊運動時間とGL後の疲労困憊運動時間で検討した。

#### 2-5. マイクロ波照射

サンプリングの2時間前からラットを絶食させ、サンプリング直前にイソフルランで全身麻酔をかけ、Kong *et al.*, (2002)の方法に従いマイクロ波照射装置（NJE-2006、新日本無線株式会社、東京）を用い、ラットに10kWのマイクロ波を1.2秒照射し屠殺した（Kong *et al.*, 2002）。

#### 2-6. 組織の採取

マイクロ波を照射したラットの頭部を断頭し、その後、筋（足底筋）、肝臓、脳を採取した。採取した脳は運動に関連のある皮質、海馬、視床下部、小脳、脳幹の5部位に分画した。採取した組織は直ちに液体窒素で凍結させ、グリコーゲン定量に用いるまで-80°Cで保存した。

## 2-7. グリコーゲンおよびグルコース濃度の定量

脳のグリコーゲンおよびグルコースの抽出は Kong ら (2002)に、グルコース濃度の測定は Passonneau & Lauderdale (1974)の方法に従った (Passonneau et al., 1974; Kong et al., 2002)。手順は以下の通りである。

### 2-7-1. グルコースの抽出

- ① 組織を6%塩酸素酸/1 mM EDTA 溶液を用いてホモジナイズした。
- ② ①のホモジネートを14,000g、4℃で10分間遠心分離し、採取した上澄みを水酸化カリウム溶液(3M水酸化カリウム(KOH)、0.3Mイミダゾール(imidazole)、0.4M塩化カリウム)でpH6~8に調節した。
- ③ 16,000g、4℃で10分間遠心分離し、上澄みを組織内に存在するグルコースを定量するサンプルとした。

### 2-7-2. グリコーゲンの抽出

- ① 組織を6%過塩素酸/1 mM EDTA 溶液を用いてホモジナイズした。
- ② グリコーゲンをグルコースに加水分解するため、①のホモジネート100μlに1mlの0.2M酢酸ナトリウム、20μlの1M炭酸水素カリウム、20U/mlのアミログルコシダーゼを加え、37℃の恒温槽内に3時間安置した。
- ③ 500μlの6%過塩素酸/1 mM EDTA 溶液を加え加水分解反応を止めた。
- ④ 14,000g、4℃で10分間遠心分離し、採取した上澄みを水酸化カリウム溶液でpH6~8の間に調整した。
- ⑤ 16,000g、4℃で10分間遠心分離し、採取した上澄みをグリコーゲンが分解されて生合成されたグルコースと組織内に元々存在するグルコースの両方を含んだサンプルとした。

### 2-7-3. グルコース濃度の測定

グルコースの測定には 96 ウェルプレートと蛍光マイクロプレートリーダー (2030 ARVO、PerkinElmer、Japan) を用いた。

- ① 各ウェルに 200 $\mu$ l の反応液 (50mM トリス-塩酸溶液 (pH 8.1)、0.5 mM アデノシン 3 リン酸、0.5 mM ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸、0.5 mM 硫酸マグネシウム、0.1U/ml グルコース 6 リン酸脱水素酵素) を加えた。
- ② 各ウェルに、30 $\mu$ l のスタンダードおよびサンプルと 0.3 U のヘキソキナーゼを加えた。
- ③ ウェルプレートを蛍光マイクロプレートリーダーで攪拌し、30 分間安置したあと、励起 355nm、発光 420nm で結晶したジヒドロニコチナミドアデニンジヌクレオチドリン酸の量からグルコース量を計算した。
- ④ グルコースは mol 濃度で表し、組織の湿重量で補正して  $\mu\text{mol/g wet tissue}$  で示した。

### 2-7-4. グリコーゲン濃度の計算

グリコーゲン濃度は、加水分解したサンプルのグルコース濃度から加水分解していないサンプルのグルコース濃度を差し引いた値とし、 $\mu\text{mol/g wet tissue}$  で示した。

### 2-8. 統計処理

統計は、GraphPad Prism 5 (GraphPad Software、USA) を用いて実施した。データはすべて平均値 $\pm$ 標準誤差で示し、グループの比較は対応のない t 検定を行った。有意水準は 5%とした。

### 3. 結果

#### 3-1. 筋および肝グリコーゲン量

GL 前後 (Pre、Post) の筋および肝グリコーゲン量を比較したところ、筋グリコーゲン量は Pre と比べ有意に増加したが、肝グリコーゲン量に変化は見られなかった (図 3 A, B)。

#### 3-2. 持久性能力

持久性能力は GL が Pre および安静群と比べ有意に向上し、運動時間の増加率は Pre に対して 58%、安静群に対して 77%であった (図 3 C)。

#### 3-3. 脳部位別のグリコーゲン量

全脳では GL 前後でグリコーゲン量に差は見られなかったものの、脳部位別に見てみると海馬および視床下部のグリコーゲン量が有意に増加した (図 3 D)。



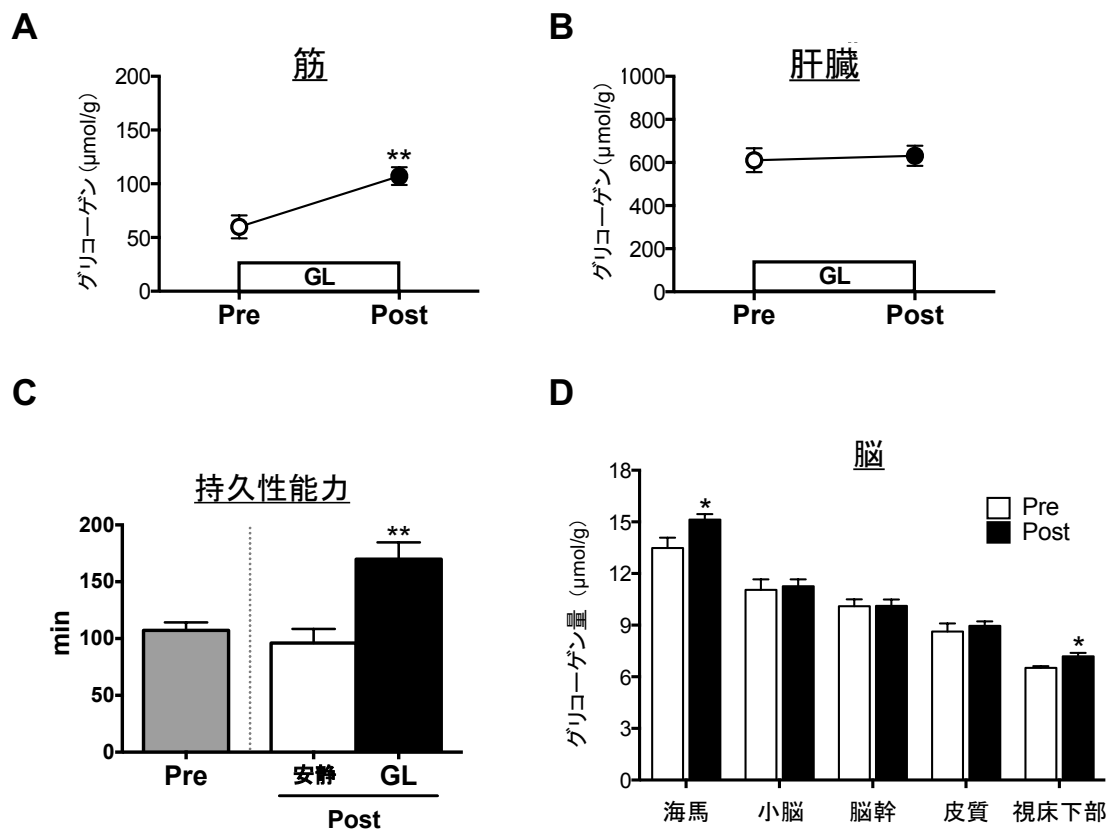


図 3 GLが筋、肝臓および脳グリコーゲン量と持久性能力に及ぼす影響

(A) 筋グリコーゲン量, (B) 肝グリコーゲン量, (C) 持久性運動能力, (D) 脳部位別グリコーゲン量の変化を示した. A, B and D: 白; Pre-GL 群 (n=8), 黒; Post-GL 群 (n=8). Values are mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  vs Pre, \*\*  $P < 0.01$  vs Pre (unpaired  $t$ -test). C: 灰および黒; Pre および Post-GL 群 (n=5), 黒; 安静群 (n=4). Values are mean  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0.01$  vs 安静 (unpaired  $t$ -test).

#### 4. 考察

研究課題 1 では、Shinohara ら (2010) がラットで確立した 1 週間の GL を参考にしたモデルを用いて (Shinohara et al., 2010)、脳グリコーゲンへの影響を検討した。その結果、GL により筋グリコーゲン量は有意に増加し、脳では海馬と視床下部のグリコーゲン量が有意に増加することが明らかとなった。

先行研究では、1 週間の GL によりラットの筋グリコーゲン量は GL 前 (Pre) と比べて約 30%の増加が見られたのに対し、本実験では 79%増加した。この結果から、本実験で用いた GL モデルの妥当性を確認するとともに、筋グリコーゲン量をより増加させるモデルの確立に成功した。本実験結果が先行研究と比べて筋グリコーゲン量の増加率が高かった理由として、運動様式および運動時間の違いが挙げられる。(Shinohara et al., 2010)が負荷付きの強制水泳運動を用いたのに対し、本実験ではトレッドミル走運動を用い、初日 (疲労困憊運動) 以降の運動時間も先行研究より長かった。Matsui ら (2012) は、一過性疲労困憊運動後に生じるグリコーゲン超回復率は運動によるグリコーゲン減少率と正の相関関係にあることを報告しており、本研究結果も運動時間の違いによる影響が考えられる。

さらに、本実験では GL により海馬と視床下部のグリコーゲン量が有意に増加することを初めて明らかにした。GL の基盤となるグリコーゲン超回復は、運動に関連のある脳部位 (海馬、視床下部、皮質、小脳、脳幹) 全てにおいて、運動後 6 時間の時点で生じ、なかでも海馬と皮質は 24 時間後まで超回復が持続することが報告されている。この結果から、運動の影響を受けやすい海馬は GL による 1 週間の運動と高糖質食によるコンディショニングが奏功したと考えられるが、同様の結果が皮質では見られず、視床下部で

確認された。

GLは1週間のプロトコルであり、運動と高糖質食を組み合わせたコンディショニング法であることから、海馬と視床下部のグリコーゲン量増加がこれらの要素とどのように関係するかを更に検討する必要がある。

## 5. 要約

本研究で用いる GL のラットモデルが筋と同様に脳グリコーゲン量を増加させるかどうかを脳部位別に検討した。その結果、1週間の GL により筋のみならず、海馬と視床下部のグリコーゲン量が増加することが明らかになった。本研究の GL による筋グリコーゲン増加率はヒトやラットにおける GL の先行研究と同等の増加率を示したことから、本研究の GL の妥当性が確認され、脳グリコーゲンへの効果が初めて明らかになった。

## 第5章 GL 期間中の海馬グリコーゲン動態の検討(研究課題2-

### 1)

#### 1. 目的

研究課題 1 では、筋グリコーゲン量を増加させ、持久性能を向上させる GL が脳にも奏功し、海馬および視床下部のグリコーゲン量を増加させることを明らかにした。本博士論文の目的は、持久性能と認知機能は相関することから (Hillman et al., 2008; Hyodo et al., 2016; Suwabe et al., 2017a)、持久性能を向上させる 1 週間の GL は認知機能をも高める可能性があり、認知機能向上に寄与する新たなコンディショニング法となり得るかどうかを明らかにすることである。脳のなかでも、学習や記憶などの認知機能を担う海馬のグリコーゲンは記憶形成に重要であることが明らかとなっており (Newman et al., 2011; Suzuki et al., 2011)、長期間の運動トレーニングにより海馬グリコーゲン量が増加し、海馬機能が高まることから (Matsui et al., 2012; Shima et al., 2016)、海馬グリコーゲン量が GL によって増加することは、本研究の仮説を強める結果と言える。特に、GL が持久性能のみならず認知機能を高めることが明らかとなれば、アスリートのみならず、試験を控える受験生や、重要なプレゼンテーション前の社会人など、高い認知機能が要求される様々な場面にむけたコンディショニング法としての「海馬 GL」が期待される。そのような場面への汎用性が高い新たな海馬 GL を提案するためには、海馬グリコーゲン量を増加させる必須条件を検討する必要がある。従来の GL は高糖質食摂取と疲労困憊運動を含む複数の運動条件が必須とされていることから、研究課題 2 では、これらの条件が海馬 GL においても重要かどうかを検討した。研究課題 2-1 では、GL の基盤となる一過性

疲労困憊運動後のグリコーゲン超回復は筋より脳で早く生じることから (Matsui et al., 2012)、1 週間の GL における筋および海馬グリコーゲン量増加のピークを明らかにするため、GL 期間中の海馬グリコーゲン動態を検討した。

## 2. 方法

### 2-1. 被験動物および飼育条件

本研究は、筑波大学動物実験指針に基づき、動物実験倫理委員会の承認を得て行われた。実験には 11 週齢の Wistar 系雄ラット (250-300g, SLC, Japan) を用いた。飼育環境は室内温度  $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $60 \pm 10\%$  に設定し、7:00~19:00 を明期とした明暗サイクルを維持した。予備飼育から走行学習期間の食餌は通常の動物用粉末飼料 (通常食: 糖質 61%、脂質 13%、タンパク質 26%) (オリエンタル酵母, Japan)、飲料水は蒸留水をそれぞれ用い、ともに 24 時間自由摂取させた。

### 2-2. 走行学習

走行学習は研究課題 1 と同様のプロトコルで行った。

### 2-3. GL

実験デザインを図 4 に示した。実験全体の流れは研究課題 1 と同様である。GL 中の海馬グリコーゲン動態を検討するために、サンプリングのタイミングを GL 前 (Pre)、GL 開始後 5 日目、6 日目、7 日目の 4 カ所とした。

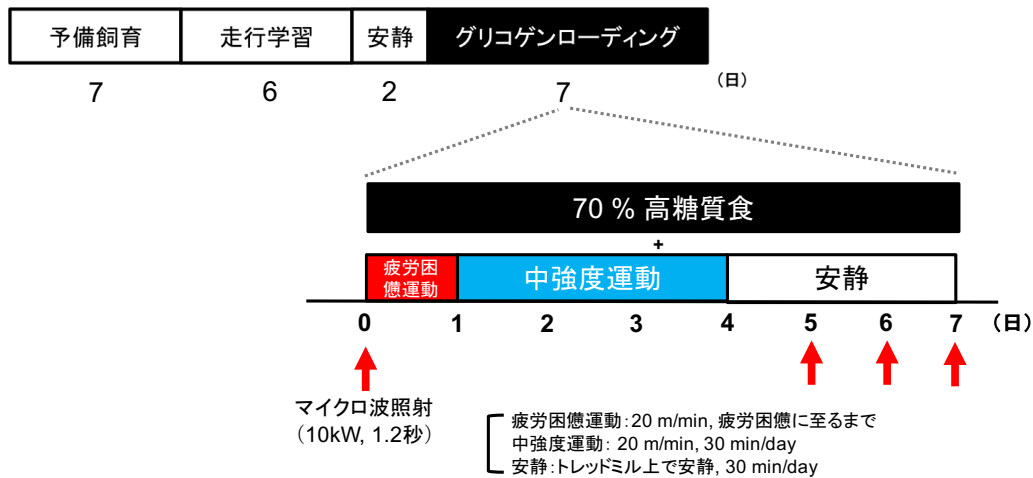


図 4 研究課題 2 – 1 実験デザイン

研究課題 2-1 の実験デザインを示した。通常食下で飼育中のラットに 6 日間の走行学習を課し、2 日間の安静を置いた後に 7 日間の GL を行った。GL では 70 % の高糖質食を摂取させながら次の運動を行った；初日：疲労困憊運動（20 m/min, 疲労困憊に至るまで）、2-4 日目：中強度運動（20 m/min, 30 min/day）、5-7 日目：安静。Pre-GL および GL 開始後 5, 6, 7 日目でラットをマイクロ波照射（10kW）によって屠殺し、筋、肝臓、脳を採取した。

#### 2-4. マイクロ波照射

マイクロ波照射は研究課題 1 と同様の手順で行った。

#### 2-5. 組織の採取

組織の採取は研究課題 1 と同様の手順で行った。採取した組織は、研究課題 1 で GL の効果が見られた筋、海馬、視床下部とし、末梢組織の肝臓と認知機能に関わる皮質についても検討した。

#### 2-6. グリコーゲンおよびグルコース濃度の定量

グリコーゲンおよびグルコース濃度の定量は研究課題 1 と同様の手順で行った。

## 2-7. 統計処理

統計は、GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, USA) を用いて実施した。データはすべて平均値±標準誤差で示し、一元配置分散分析の後、*post-hoc* テスト (Dunnett) を行った。有意水中は5%とした。

### 3. 結果

#### 3-1. 筋・肝・海馬・視床下部および皮質グリコーゲン量

GLにより、筋、肝、海馬、視床下部のグリコーゲンは5日目から有意に増加し、7日目に最大値を示した(図5A、B、C、D)。Preに対する7日目のグリコーゲン量増加率はそれぞれ、筋:55%、肝:45%、海馬:23%、視床下部:29%であった。

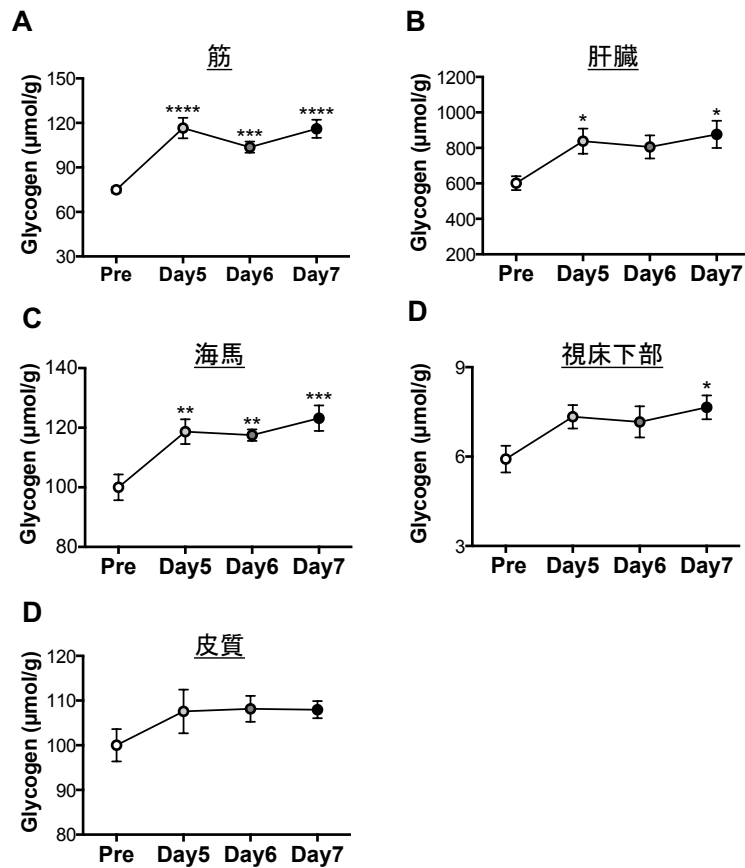


図 5 GL 期間中の筋、肝臓および脳グリコーゲン量の経時的変化

GL 期間中の筋 (A), 肝臓 (B), 海馬 (C), 視床下部 (D), 皮質 (E) におけるグリコーゲン量の経時的変化を示した. Pre: n=8, Day 5: n=8, Day 6: n=8, Day 7: n=7. Values are mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  vs Pre, \*\* $p < 0.01$  vs Pre, \*\*\* $p < 0.005$  vs Pre, \*\*\*\* $p < 0.001$  vs Pre (One-way ANOVA, Dunnett's *post-hoc* test).



#### 4. 考察

研究課題 2-1 において、海馬グリコーゲン量が最も増加するタイミングを明らかにするため、GL 期間中の海馬グリコーゲン動態を検討したところ、海馬 GL は GL 開始後 5 日目から有意な増加が見られ、7 日目で最大値を示した。

先行研究では、一過性疲労困憊運動後に生じるグリコーゲン超回復は筋が運動の 24 時間後に生じるのに対し、海馬を含む全ての脳部位は運動の 6 時間後に生じることから (Matsui et al., 2012)、GL における海馬グリコーゲン量が最も増加するタイミングは筋より早期に生じる可能性が考えられたが、GL による海馬グリコーゲン量の増加は筋同様の動態を示した。GL のプロトコルは初日に疲労困憊運動を行い、続く 3 日間は中強度運動を行った後に 3 日間はこの安静をとらせるが、初日の疲労困憊運動後に超回復した筋、海馬および視床下部のグリコーゲンは GL 期間中にその増加を維持したことが考えられる。より短期的な GL を行う場合、グリコーゲン量から考えると本実験で検討した 5 日間のプロトコルでも可能かもしれないが、持久性運動パフォーマンスや認知機能向上が伴うかどうかは不明であり、グリコーゲン量とこれらの能力や機能が相関するかどうかは今後検討する必要がある。

#### 5. 要約

研究課題 2-1 では海馬を標的とした GL を開発するために、GL 期間中に海馬グリコーゲン量が最も増加するタイミングを GL 開始後 5、6 および 7 日目で検討した。その結果、海馬グリコーゲンは GL 開始後 5 日目から有意に増加し、その増加は 7 日目まで維持されることが明らかとなり、筋と同

様の動態を示した。これにより、持久性能力を高める筋の1週間のGLと同様に、海馬GLも1週間での検討が望ましいことが示唆された。

## 第6章 GLにおける高糖質食が海馬グリコーゲン量に及ぼす影響 (研究課題2-2)

### 1. 目的

研究課題2-1では、GL期間中の海馬グリコーゲン動態は、グリコーゲンを測定したGL開始後5日目の時点で有意な増加を示し、その増加は7日目まで持続し、この動態は筋でも同様であることが明らかになった。持久性能力を高めるGLは1週間で行われてきたことから、海馬GLの認知機能への効果を検証する本研究においても、海馬グリコーゲン量増加が確認された1週間のプロトコルを用いて、海馬GLの必須条件を明らかにすることとした。そこで、研究課題2-1では、1週間のGLによる海馬グリコーゲン量の増加に従来のGLの構成要素である高糖質食が必須かどうかを検討した。

### 2. 方法

#### 2-1. 被験動物および飼育条件

本研究は、筑波大学動物実験指針に基づき、動物実験倫理委員会の承認を得て行われた。実験には11週齢のWistar系雄ラット(250-300g, SLC, Japan)を用いた。飼育環境は室内温度  $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $60 \pm 10\%$  に設定し、7:00~19:00を明期とした明暗サイクルを維持した。予備飼育から走行学習期間の食餌は通常の動物用粉末飼料(通常食:糖質61%、脂質13%、タンパク質26%) (オリエンタル酵母, Japan)、飲料水は蒸留水をそれぞれ用い、ともに24時間自由摂取させた。

## 2-2. 走行学習

走行学習は研究課題1と同様のプロトコルで行った。

## 2-3. GL

実験デザインを図6に示した。実験全体の流れは研究課題1と同様である。GL中の糖質摂取量が海馬グリコーゲン量に及ぼす影響を検討するために、糖質濃度の異なる3つの食餌群を設け、研究課題1および2-1と同様の運動を課すGLを行った。サンプリングは海馬グリコーゲン量が最も増加する7日目に行った。3つの食餌群の栄養成分と食餌中の糖質、脂質および蛋白質配合比をそれぞれ表1および表2に示した。

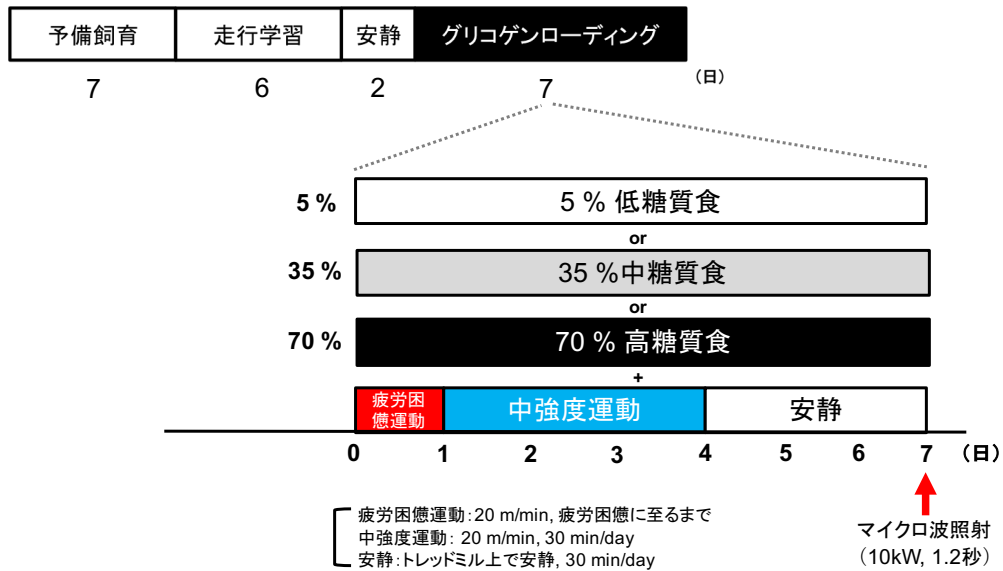


図 6 研究課題 2 - 2 実験デザイン

研究課題 2-2 の実験デザインを示した。通常食下で飼育中のラットに 6 日間の走行学習を課し，2 日間の安静を置いた後に 7 日間の GL を行った。GL では 5 % または 35% または 70 % の高糖質食を摂取させながら次の運動を行った；初日：疲労困憊運動（20 m/min，疲労困憊に至るまで），2-4 日目：中強度運動（20 m/min，30 min/day），5-7 日目：安静。GL 7 日目にラットをマイクロ波照射（10kW）によって屠殺し，筋，肝臓，脳（海馬，視床下部および皮質）を採取した。

表 2 食餌中の栄養成分

食餌中の成分	5%	35%	70%
カゼイン	23.1	23.1	23.1
DL-メチオニン	0.3	0.3	0.3
コーンスターチ	0.0	27.8	60.1
スクロース	4.6	4.6	4.6
コーン油	9.6	5.5	0.7
ラード	19.2	10.9	1.4
セルロースパウダー	38.5	23.1	5.1
AIN-76 ミネラルミックス	3.5	3.5	3.5
AIN-76 ビタミンミックス	1.0	1.0	1.0
重酒石酸コリン	0.2	0.2	0.2
Total (%)	100.0	100.0	100.0

表 3 食餌中の糖質、脂質および蛋白質比

食餌群	栄養素	含量 (g)	カロリー比 (%)	エネルギー (kcal/100g)	総カロリー (kcal/100g)
5%	糖質	4.6	5.0	18.5	370.0
	脂質	28.8	70.0	259.0	
	蛋白質	23.1	25.0	92.5	
35%	糖質	32.4	35.0	129.5	370.0
	脂質	16.4	40.0	148.0	
	蛋白質	23.1	25.0	92.5	
70%	糖質	64.8	70.0	259.0	370.0
	脂質	2.1	5.0	18.5	
	蛋白質	23.1	25.0	92.5	

#### 2-4. マイクロ波照射

マイクロ波照射は研究課題 1 と同様の手順で行った。

#### 2-5. 組織の採取

組織の採取は研究課題 1 と同様の手順で行った。採取した組織は、研究課題 2-1 と同様である。GL による海馬グリコーゲンの増加に対する高糖質の影響を検討するため、サンプリングは海馬グリコーゲン量が最も増加する 7 日目に行った。

#### 2-6. 血糖値の測定

ラットをマイクロ波で屠殺時に断頭血を採取し、断頭血からグルコース/ラクテートアナライザーを用いて血中乳酸および血糖値を測定した。

#### 2-7. グリコーゲンおよびグルコース濃度の定量

グリコーゲンおよびグルコース濃度の定量は研究課題 1 と同様の手順で行った。

#### 2-8. 統計処理

統計は、GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, USA) を用いて実施した。データはすべて平均値±標準誤差で示し、一元配置分散分析の後、*post-hoc* テスト (Dunnett) を行った。有意水中は 5% とした。

### 3. 結果

#### 3-1. 総摂食量、総摂取カロリー、総糖質摂取量、体重および血糖値

GL 中のラットの摂食量は糖質濃度の異なる食餌群間で有意な差は見られなかった (図 7 A)。糖質濃度の異なる各食餌群は摂食量 100g あたりの総カロリーが同一になるよう調整してあるため、総カロリー摂取量は 3 群間で有意な差は見られなかった (図 7 B)。総糖質摂取量は群間で有意な差があり、食餌中の糖質濃度依存的に有意な増加を示した (図 7 C)。GL 中に異なる食餌を摂取したことによる体重への影響は見られなかった (図 7 D)。GL 時に摂取した異なる糖質濃度の食餌は血糖値に影響を及ぼさなかった (図 7 E)。



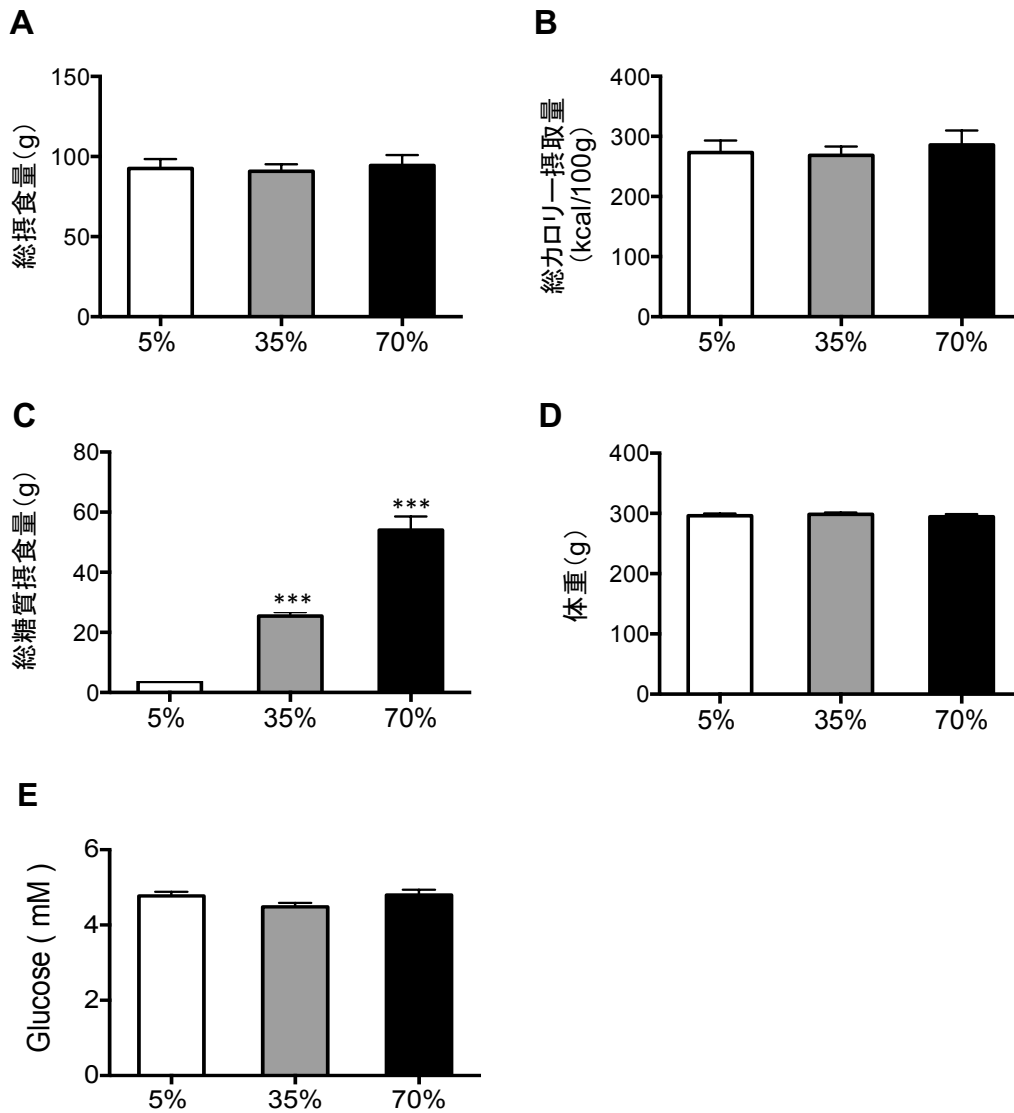


図 7 GL における糖質濃度の異なる食餌が総摂食量、総摂取カロリー量、総糖質摂取量、体重および血糖値に及ぼす影響

GL における糖質濃度の異なる食餌が総摂食量 (A), 総摂取カロリー量 (B), 総糖質摂取量 (C), 体重 (D) および血糖値 (E) に及ぼす影響を示した. 5%: n=7, 35%: n=8, 70%: n=8. Values are mean  $\pm$  SEM. \*\*\* $p$  < 0.001 vs 5% (One-way ANOVA, Dunnett's *post-hoc* test).

### 3-2. 筋、肝、海馬、視床下部および皮質グリコーゲン量

糖質濃度の異なる食餌群間のグリコーゲン量は筋および全ての脳部位で有意な差は見られなかった (図 8 A、C)。一方、肝臓の 5%糖質濃度の食餌群のグリ原料は 70%糖質濃度群に対して有意な低値を示した (図 8 B)。

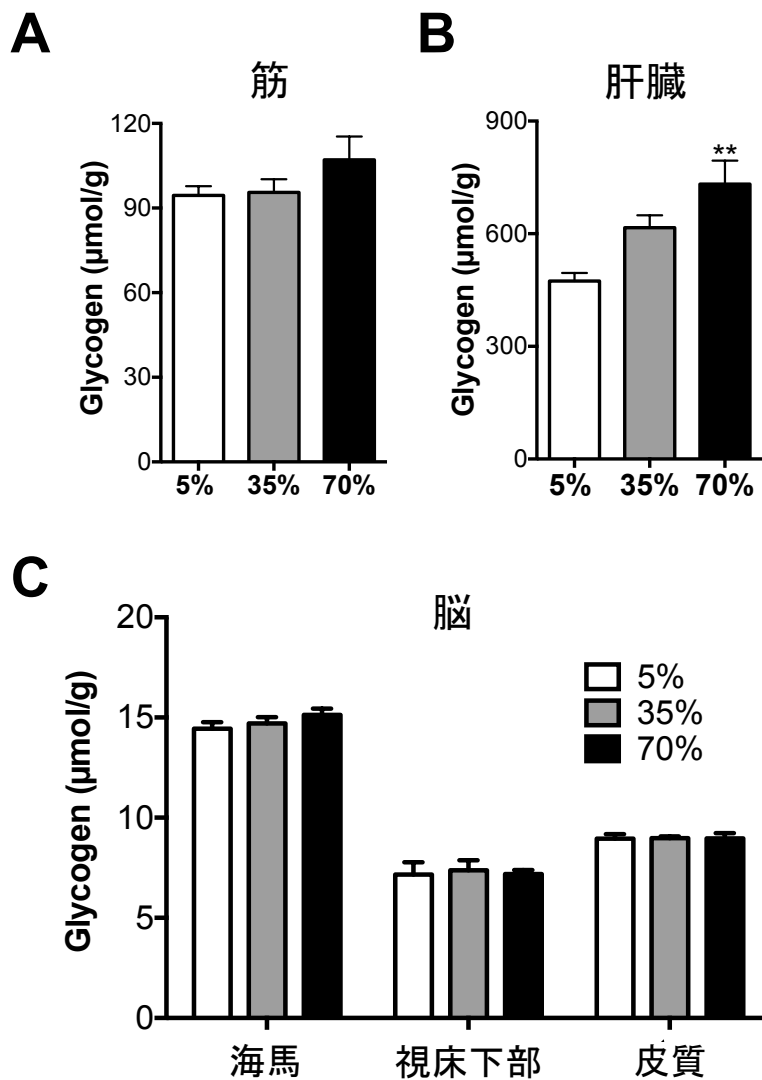


図 8 筋、肝臓および脳グリコーゲン量

GL における糖質濃度の異なる食餌が GL 7 日目の筋 (A), 肝臓 (B), 脳 (海馬, 視床下部 および皮質) に及ぼす影響を示した. 5%: n=7, 35%: n=8, 70%: n=8. Values are mean  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0.01$  vs 5% (One-way ANOVA, Dunnett's *post-hoc* test).

### 3-3. 糖質摂取量と筋・肝・海馬・視床下部および皮質グリコーゲン量の相関

筋と肝臓において、総糖質摂取量とグリコーゲン量との間に有意な正の相関が認められた (図9 A、B)。

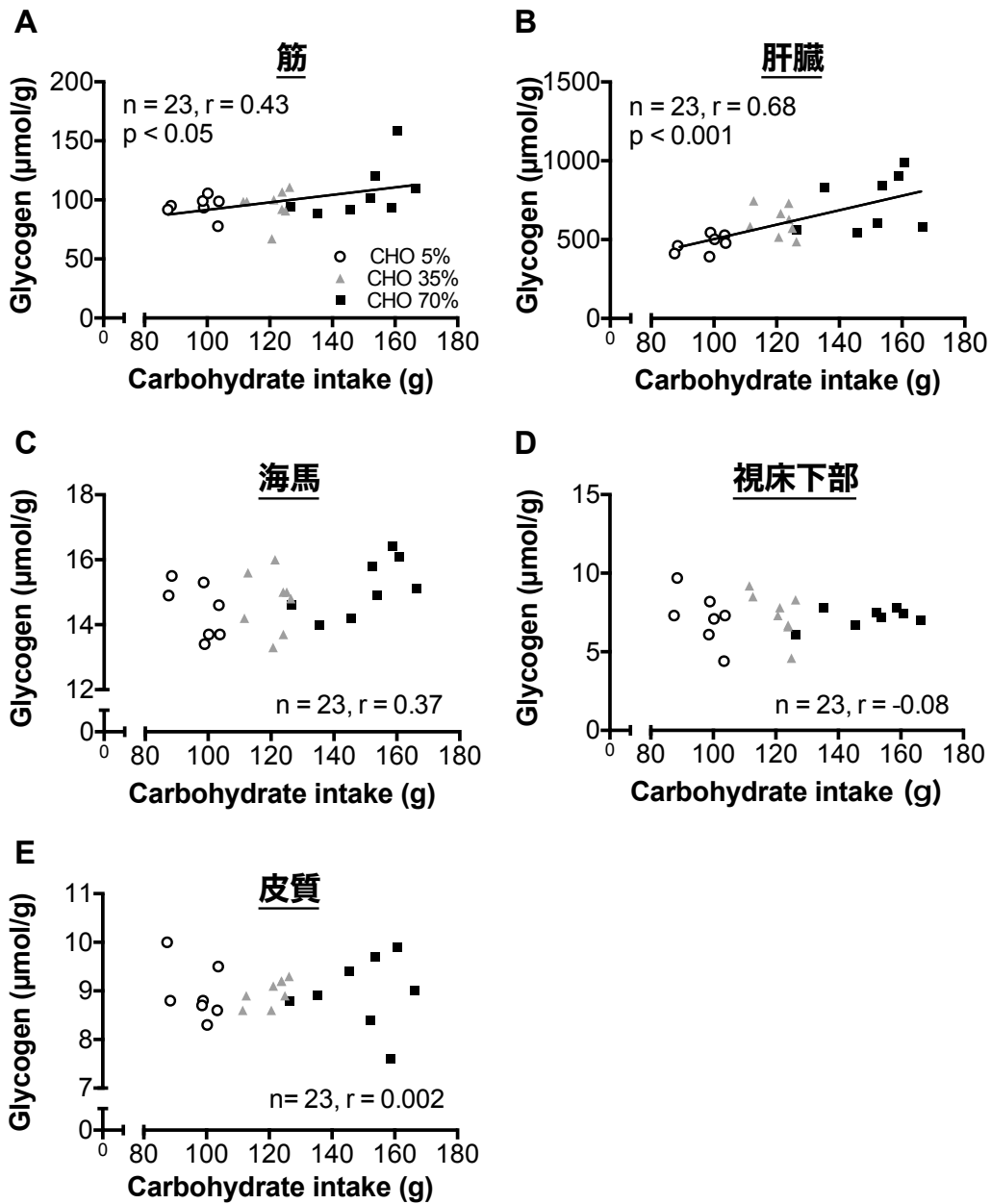


図9 総糖質摂取量と筋、肝臓および脳グリコーゲン量との相関関係

筋 (A), 肝臓 (B), 海馬 (C), 視床下部 (D) および皮質 (E) における糖質摂取量とグリコーゲン量との相関関係を示した. 5%:  $n=7$ , 35%:  $n=8$ , 70%:  $n=8$ .

#### 4. 考察

研究課題 2-2 では、GL の 2 つの要素（高糖質食と運動）の中の 1 つである高糖質食が海馬グリコーゲン量の増加に必須かどうかを明らかにするために、糖質濃度の異なる食餌と運動を組み合わせた GL の影響を検討した。その結果、筋および肝グリコーゲンは糖質摂取依存的に増加したのに対し、海馬やその他の部位でも相関関係は見られなかった。

本実験で用いた糖質濃度の異なる 3 つの食餌群（5%、35%、70%）は、全ての群間において、ラットの総摂食量、総カロリー摂取量および体重に有意な差はなく（図 7 A, B, D）、総糖質摂取量のみ食餌中の糖質濃度依存的に有意な高値を示した（図 7 C）。本実験では、海馬グリコーゲン量の増加に対する高糖質食の影響を検討するため、各食餌群の粉末飼料を 100g あたり同カロリーとなるよう調整したことから、これらの結果はその調整法の妥当性を示唆しており、血糖値も群間に差は見られないことを確認した（図 7 E）。

筋グリコーゲン量は群間で有意な差はなかったが（図 8 A）70%の高糖質食群が高値を示す傾向があり、肝臓では 70%の食餌群が 5%の食餌群に対して有意な高値を示した（図 8 B）。筋および肝グリコーゲン量は糖質摂取量との間に正の相関が認められたことから（図 9 A, B）、糖質摂取依存的なグリコーゲン合成機構の関与が想定される。

これまで、GL に関する先行研究では、異なる糖質摂取量の違いが筋および肝グリコーゲン量に及ぼす影響を検討したものはほとんどなく（Shinohara et al., 2010）、本実験で得られた結果は新たな知見として興味深い。先行研究では、一過性疲労困憊運動の前後で糖質摂取量が筋グリコーゲン量に及ぼす影響を検討したものが多く（Bergström et al., 1966; Saitoh et al., 1993, 1994;

Hawley et al., 1997b)、運動後の筋グリコーゲン量の回復および超回復は糖質摂取量依存的と考えられており、本実験はそれを支持するものといえる。しかし、筋グリコーゲンは糖質摂取量との間に有意な相関がみられたものの、7日目の時点での3つの食餌群間のグリコーゲン量に有意な差が消失した点は予想に反するものとなった。本実験で行った1週間のGLは低糖質食群(5%, 35%群)においても、70%の高糖質食群と同程度に回復したからである。これは、一過性長時間運動後の低糖質食摂取は糖質濃度が低くても0% (脂質とタンパク質のみ) でなければ筋グリコーゲンは超回復しないものの回復することから説明できるかもしれない (Suzuki et al., 1984; Conlee et al., 1990; Saitoh et al., 1994)。一方、海馬、視床下部および皮質では全ての群間のグリコーゲン量に差はなく (図8C)、糖質摂取量との間にも相関関係は認められなかったことから (図9C-E)、糖質に依存しないグリコーゲン合成機構の関与が示唆される。筋では、運動により減少したグリコーゲンの超回復には糖質摂取が重要であり (Bergström et al., 1966, 1967, Saitoh et al., 1993, 1994; Hawley et al., 1997a)、インスリンを介したグリコーゲン合成機構が重要な役割を担っている (Cartee et al., 1989; Zawadzki et al., 1992)。一方、脳におけるグリコーゲン合成機構は不明な点が多く、脳においてもインスリン受容体は存在し (Havrankova et al., 1978)、インスリンがグリコーゲン合成に関わることを示す知見がわずかに存在するが (Dringen et al., 1992; Hamai et al., 1999; Heni et al., 2011)、本実験で得られた結果からもインスリンの貢献は低いと考えられる。その他の脳グリコーゲン合成機構として現在の所分かっているのは、ノルアドレナリン (NA)、血管作用性小腸ペプチド (VIP) やグルタミン酸 (Swanson et al., 1990; Sorg et al., 1992) であり、インスリンのみならず、これらの関与を今後検討する必要がある。

## 5. 要約

研究課題 2-2 では海馬を標的とした GL の開発にむけて、GL の 2 つの要素（高糖質食と運動）の中の 1 つである高糖質食が海馬グリコーゲンの増加に必須かどうかを明らかにするために、糖質濃度の異なる食餌と運動を組み合わせた GL の影響を検討した。その結果、筋や肝とは異なり、海馬グリコーゲンの増加に高糖質は必須でないことが明らかとなった。これにより、海馬を標的とした GL は糖質濃度を調整するための食餌内容の変更は不要であることが示唆された。

## 第7章 GLにおける運動が海馬グリコーゲン量に及ぼす影響(研究課題2-3)

### 1. 目的

研究課題2-2ではGLの2つの要素(高糖質食と運動)のうち1つである高糖質食は海馬グリコーゲン量の増加に必須でないことが明らかとなり、運動の重要性が示唆された。この結果は従来のGLと異なる点であり、海馬GLでは通常食を用いた、普段と変わらない食事で実現可能であることを意味する。一方、GLの基盤は一過性疲労困憊運動後に生じる筋グリコーゲン超回復であり、運動をしなければグリコーゲン超回復は生じないことが明らかになっていることから(Bergström et al., 1966)、GLによる海馬グリコーゲン量増加にも疲労困憊運動を含む運動は必須条件であると考えられる。そこで、研究課題2-3ではGLの構成要素である運動(疲労困憊運動とその後の運動および休養)が海馬グリコーゲン量の増加に必須であるかどうかを検討する。

### 2. 方法

#### 2-1. 被験動物および飼育条件

本研究は、筑波大学動物実験指針に基づき、動物実験倫理委員会の承認を得て行われた。実験には11週齢のWistar系雄ラット(250-300g、SLC、Japan)を用いた。飼育環境は室内温度  $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $60 \pm 10\%$  に設定し、7:00~19:00を明期とした明暗サイクルを維持した。予備飼育から走行学習期間の食餌は通常の動物用粉末飼料(通常食:糖質61%、脂質13%、タンパク質26%)(オリエンタル酵母、Japan)、飲料水は蒸留水をそれぞれ用い、ともに24時間自由摂取させた。

## 2-2. 走行学習

走行学習は研究課題1と同様のプロトコルで行った。

## 2-3. GL

実験デザインを図10に示した。実験全体の流れは研究課題1と同様である。GL中の運動が海馬グリコーゲン量に及ぼす影響を検討するために、高糖質食+運動(HCD+Ex)群または高糖質食+安静群(HCD+Sed)の2群に分け、運動群には研究課題1および2-1と同様の運動を課すGLを行った。サンプリングのタイミングは研究課題2-2と同様で行った。

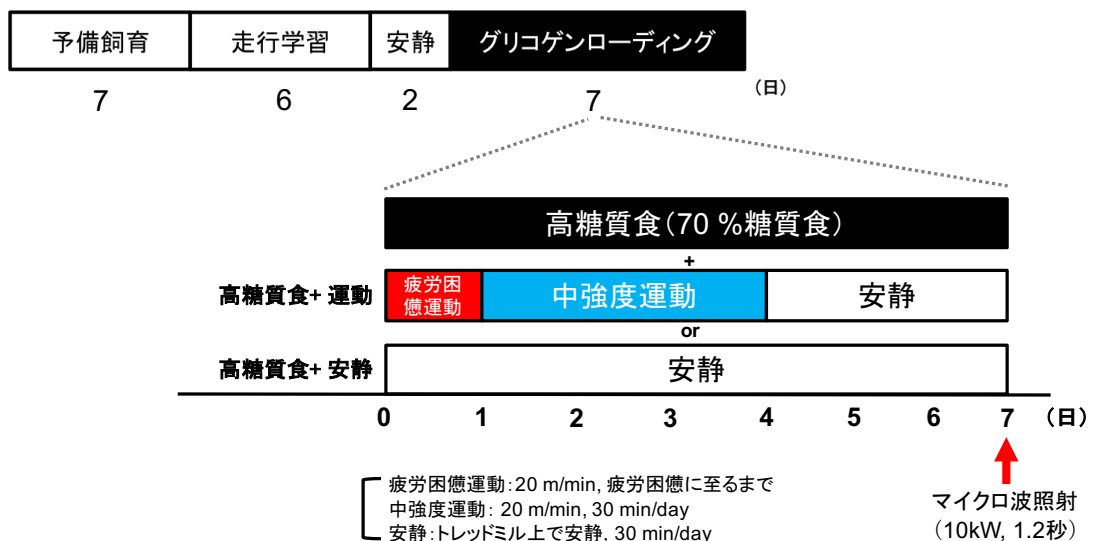


図10 研究課題2-3実験デザイン

研究課題2-3の実験デザインを示した。通常食下で飼育中のラットに6日間の走行学習を課し、2日間の安静を置いた後に7日間のGLを行った。GLでは7日間の高糖質食と安静を課す(HCD+Sed)群と、7日間の高糖質食と運動(初日:疲労困憊運動(20 m/min, 疲労困憊に至るまで), 2-4日目:中強度運動(20 m/min, 30 min/day), 5-7日目:安静)を課す(HCD+Ex)群に分けた。GL7日目にラットをマイクロ波照射(10kW)によって屠殺し、筋、肝臓、脳(海馬、視床下部、皮質)を採取した。



#### 2-4. マイクロ波照射

マイクロ波照射は研究課題 1 と同様の手順で行った。

#### 2-5. 組織の採取

組織の採取は研究課題 1 と同様の手順で行った。採取した組織は研究課題 2-1 と同様である。

#### 2-6. グリコーゲンおよびグルコース濃度の定量

グリコーゲンおよびグルコース濃度の定量は研究課題 1 と同様の手順で行った。

#### 2-7. 統計処理

統計は、GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, USA) を用いて実施した。データはすべて平均値±標準誤差で示した。グループの比較は対応のない t 検定を行った。有意水準は 5%とした。

### 3. 結果

#### 3-1. 筋、肝、海馬、視床下部および皮質グリコーゲン量

GL により、HCD+Ex 群の筋、海馬および視床下部のグリコーゲン量が HCD+Sed 群と比べ高値を示した (図 11)。

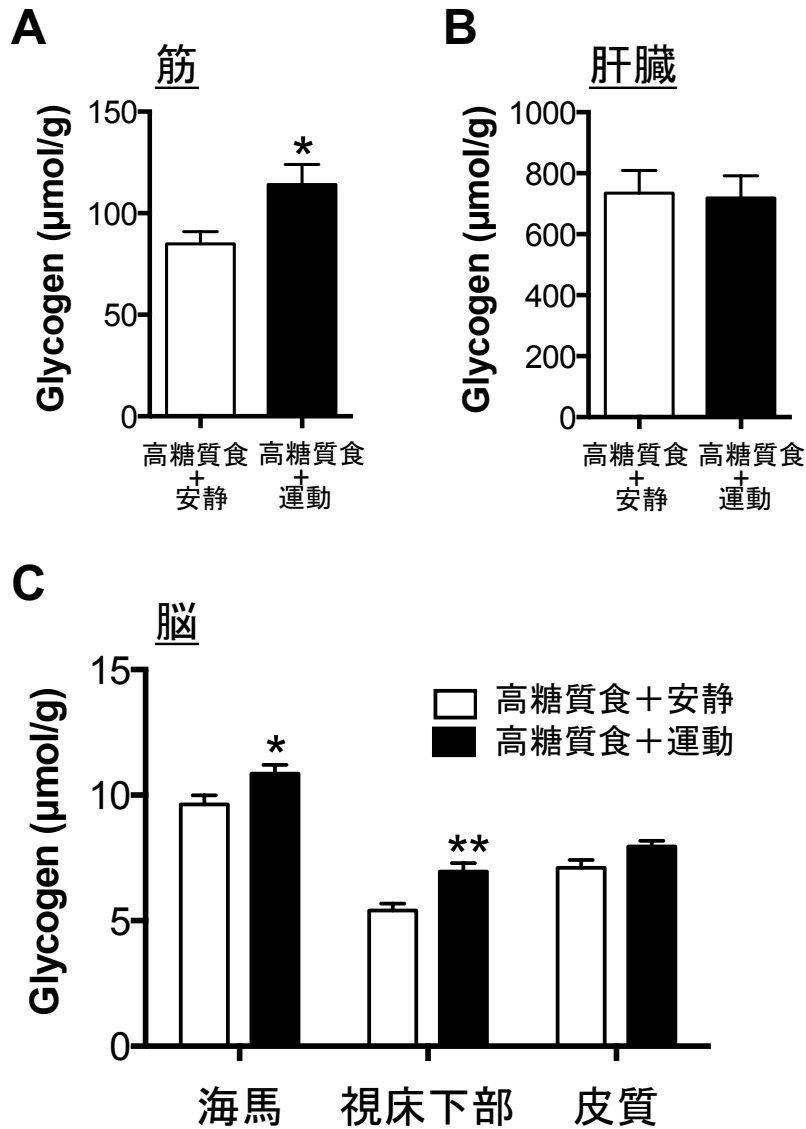


図 11 GL における運動が筋、肝臓および脳グリコーゲン量に及ぼす影響  
GL における運動が GL 7 日目の筋 (A), 肝臓 (B), 脳 (海馬, 視床下部, 皮質) に及ぼす影響を示した. 白: 高糖質食+安静 (n=5), 黒: 高糖質食+運動 (n=4). Values are mean ± SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs 高糖質食+安静 (unpaired  $t$ -test).

#### 4. 考察

研究課題 2-3 では、GL における運動が海馬グリコーゲン貯蔵の増加に及ぼす影響について検討した。GL において、運動（初日の疲労困憊運動 + 中強度運動）と高糖質食摂取を行った群（運動群）が、安静と高糖質食を摂取した群（安静群）に比べ、7 日目の時点で筋・海馬・視床下部グリコーゲンの有意な高値を示すことが明らかとなった（図 11）。一過性疲労困憊運動後の筋グリコーゲン超回復はグリコーゲン枯渇運動後に見られ、運動時のグリコーゲン利用が多いほどグリコーゲン合成が高まることから (Bergström et al., 1966; Matsui et al., 2012)、運動群が安静群に比べ有意にグリコーゲン量を増加させた可能性がある。

脳グリコーゲンが増加するメカニズムのほとんどは未だ解明されていないが、いくつかの先行研究で示されているノルアドレナリン (NA) が関与している可能性が考えられる。興奮性神経伝達物質である NA とその代謝は運動時に高まり (Pagliari et al., 1995; Kitaoka et al., 2010; Wang et al., 2013)、その代謝産物である MHPG の運動に伴う増加と一過性疲労困憊運動後に減少する皮質グリコーゲンとの間に負の相関関係があるとされている (Matsui et al., 2011)。また、培養細胞系（アストロサイト）に対する NA 投与は、その直後にグリコーゲン分解を促すが、数時間後はアストロサイト内の PTG (protein targeting to glycogen) タンパク質発現を誘導することでインスリン非依存的にグリコーゲン合成を促進する作用のあることも報告されている (Sorg et al., 1992)。したがって、GL における運動（疲労困憊運動 + 中強度運動）が NA 作動性神経の活性化を通じて海馬グリコーゲンを分解し、その後の休息時間にグリコーゲン合成を高めたことが推測されるが、これについては今後更なる検討が必要である。

## 5. 要約

研究課題 2-3 では海馬を標的とした GL の開発にむけて、GL の 2 つの要素（高糖質食と運動）の中の 1 つである運動（疲労困憊運動とその後 3 日の中強度運動および安静）が海馬グリコーゲンの増加に必須かどうかを明らかにするために、高糖質食と運動の有無が海馬グリコーゲン量に及ぼす影響を検討した。その結果、海馬グリコーゲンの増加は筋同様に高糖質食と運動群が高値を示した。これにより、海馬を標的とした GL には筋同様に運動が必須であることが明らかとなった。

## 第8章 海馬グリコーゲン量増加に必須な運動条件の検討(研究課題2-4)

### 1. 目的

研究課題2-4では、GL中の運動は筋同様に海馬グリコーゲン量増加に必須の条件であることが明らかになった。しかしながら、GLにおける運動は初日の疲労困憊運動と、続く3日間の中強度運動、そして最後の3日間の休養から構成されているため、これらの運動条件の中で海馬GLの必須条件を明らかにする必要がある。脳グリコーゲン合成機構はまだ不明な点が多いが、その有力候補であるNAを介した合成機構を活性化する可能性がある運動は疲労困憊運動である (Pagliari et al., 1995; Ohiwa et al., 2006; Kitaoka et al., 2010; Wang et al., 2013)。先行研究では、一過性疲労困憊運動時に増加するNAの代謝産物であるMHPGと脳グリコーゲン減少との間に負の相関関係があり (Matsui et al., 2011)、さらに、NAは短時間の効果として脳グリコーゲンを減少させる一方、長時間の効果としてはPTGの合成を介した脳グリコーゲン合成効果があることを報告している (Sorg et al., 1992; Allaman et al., 2000)。これらのことから、GLにおける運動条件の中でも疲労困憊運動は海馬GLに必須の条件となることが考えられる。そこで、研究課題2-4では、研究課題2-2の結果を踏まえて通常食下で行い、GLにおける運動を4条件に分けて海馬グリコーゲン量を検討した。

### 2. 方法

#### 2-1. 被験動物および飼育条件

実験には11週齢のWistar系雄ラット(250-300g、SLC、Japan)を用いた。

飼育環境は室内温度  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度  $60 \pm 10\%$  に設定し、7:00~19:00を

明期とした明暗サイクルを維持した。動物用固形飼料（通常食：糖質 61 %、脂質 13 %、タンパク質 26 %）（オリエンタル酵母、Japan）および蒸留水は、ともに 24 時間自由摂取させた。

## 2-2. 走行学習

走行学習は研究課題 1 と同様のプロトコルで行った。

## 2-3. GL

実験デザインを図 12 に示した。実験全体の流れは研究課題 1 と同様である。海馬グリコーゲン量を特異的に増加させる運動条件を検討するため、これまでと同様の運動（疲労困憊運動（20 m/min、疲労困憊に至るまで）とその後 3 日間の中強度運動（20 m/min、30 min/day）、3 日間の安静）を行う疲労困憊+中強度群、初日の疲労困憊運動後 6 日間の安静をとらせる疲労困憊群、2-4 日目に中強度運動を行う中強度群、7 日間全て安静をとらせる安静群の 4 グループに群分けした。全ての群は予備飼育から GL 最終日まで通常食を摂取させた。サンプリングは GL の 7 日目に実施した。

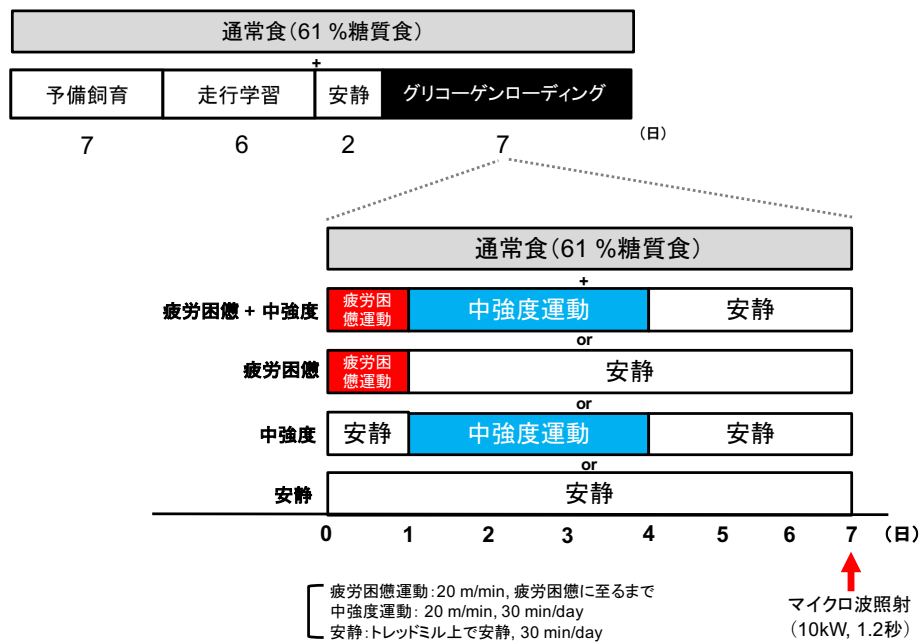


図 12 研究課題 2 - 4 実験デザイン

研究課題 2-4 の実験デザインを示した。通常食下で飼育中のラットに 6 日間の走行学習を課し、2 日間の安静を置いた後に 7 日間の GL を行った。GL ではこれまでと同様の運動（初日：疲労困憊運動（20 m/min, 疲労困憊に至るまで）、2-4 日目：中強度運動（20 m/min, 30 min/day）、5-7 日目：安静）を行う Exh+Mod 群、初日の疲労困憊運動のみを行う Exh 群、2-4 日目の中強度運動（20 m/min, 30 min/day）のみを行う Mod 群、7 日目安静をとらせる Sed 群に分けた。GL 7 日目にラットをマイクロ波照射（10kW）によって屠殺し、筋、肝臓、脳（海馬、視床下部および皮質）を採取した。

#### 2-4. マイクロ波照射

マイクロ波照射は研究課題 1 と同様の手順で行った。

#### 2-5. 組織の採取

組織の採取は研究課題 1 と同様の手順で行った。採取した組織は、研究課題 1 で GL の効果が見られた筋、海馬、視床下部とし、末梢組織の肝臓と認知機能に関わる皮質についても検討した。

#### 2-6. グリコーゲンおよびグルコース濃度の定量

グリコーゲンおよびグルコース濃度の定量は研究課題 1 と同様の手順で行った。

#### 2-7. 統計処理

統計は、GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, USA) を用いて実施した。データはすべて平均値±標準誤差で示した。グループの比較は一元配置分散分析 (One-way ANOVA) のあと、*post-hoc* テスト (Dunnett's) を行った。有意水準は 5%とした。



### 3. 結果

#### 3-1. 筋、肝、脳グリコーゲン量

筋および肝臓のグリコーゲン量は全ての群間に有意な差は見られなかった (図 13A、B)。一方、脳では海馬でのみ、疲労困憊運動を行った疲労困憊+中強度群および疲労困憊群が安静群と比べ有意な高値を示した (図 13C)。視床下部および皮質のグリコーゲン量は群間に有意な差は見られなかった。

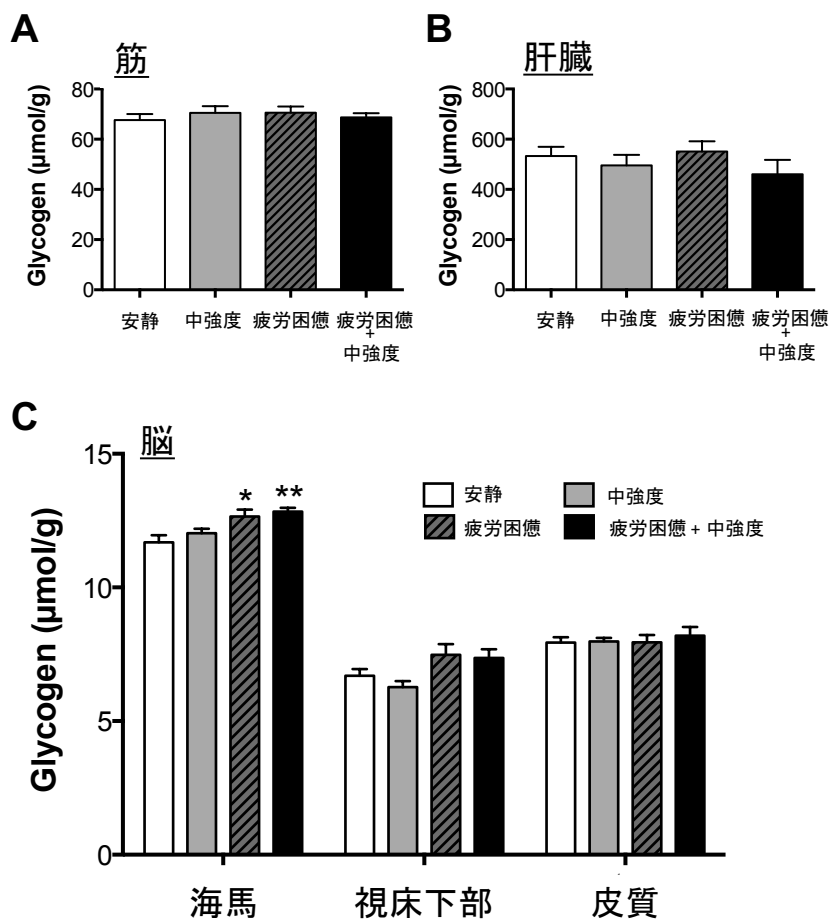


図 13 GL 期間中の運動条件が筋、肝臓および脳グリコーゲン量に及ぼす影響

GL における運動が GL 7 日目の筋 (A), 肝臓 (B), 脳 (海馬, 視床下部, 皮質) に及ぼす影響を示した. 白: 安静 ( $n=10$ ), 灰: 中強度 ( $n=10$ ), 斜線: 疲労困憊 ( $n=6$ ), 黒: 疲労困憊+中強度 ( $n=5$ ). Values are mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  vs Sed, \*\* $p < 0.01$  vs 安静 (One-way ANOVA, Dunnett's *post-hoc* test).

#### 4. 考察

研究課題 2-4 では、GL 期間中の運動条件が海馬グリコーゲン量に及ぼす影響を明らかにすることで、海馬特異的にグリコーゲン量を増加させる海馬 GL が可能かどうかを検討した。これまでの研究課題において、GL による海馬グリコーゲン量の増加には高糖質食が必須でないこと（研究課題 2-2）や GL 期間中の運動（疲労困憊運動とその後の運動および休養）は必須であること（研究課題 2-3）が明らかとなったことから、研究課題 2-4 では、通常食を用いて、GL 期間中に必須の運動条件を検討した。その結果、疲労困憊運動を行った疲労困憊+中強度群および疲労困憊群のグリコーゲン量が海馬でのみ安静群と比べ有意な高値を示したことから（図 13C）、疲労困憊運動が海馬 GL を実現させる必須要素であることが明らかになった。

一過性疲労困憊運動後の脳グリコーゲン超回復は全ての脳部位（海馬、皮質、視床下部、小脳および脳幹）で運動後 6 時間に生じ、海馬と皮質においては運動後 24 時間までその増加が見られたことから（Matsui et al., 2012）、海馬と皮質のグリコーゲン代謝は疲労困憊運動時に影響を受けやすいことが想定された。しかしながら、疲労困憊運動後 7 日目まで検討した本研究においては、グリコーゲン量の増加が見られた脳部位は海馬のみであった。海馬と皮質に限らず、脳部位別に見てグリコーゲン代謝の違いがあるかどうかは未だ不明だが、GL による脳グリコーゲン増加のタイミングを検討した本研課題 2-1 においても、海馬が GL 開始後 5 日目の時点で増加が見られたのに対し（図 5C）、皮質ではその増加が見られなかったことから（図 5D）、皮質のグリコーゲンは疲労困憊運動後に超回復するものの、その後 5 日以内で安静レベルに戻ることが考えられ、海馬と皮質では異なるグリコ

ーゲン合成機構を有する可能性が示唆され、今後更なる検討が必要である。

海馬 GL の背景として想定されるメカニズムに NA を介したグリコーゲン合成機構が想定される。NA 作動性神経は高強度や長時間運動時に活性化だけでなく (Pagliari et al., 1995; Ohiwa et al., 2006; Kitaoka et al., 2010; Wang et al., 2013)、疲労困憊運動によるグリコーゲン超回復は海馬において海馬と皮質のグリコーゲン超回復が一過性疲労困憊運動による脳グリコーゲン減少と NA の代謝産物である MHPG の増加は負の相関関係にあることから (Matsui et al., 2011)、脳グリコーゲン減少には NA が関与することが示唆されており、さらにこの NA は短時間では脳グリコーゲン分解に作用し、長時間では PTG (protein targeting to glycogen) の合成を介してグリコーゲン合成を促進することが培養実験で証明されていることから (Sorg et al., 1992; Allaman et al., 2000; Magistretti, 2006)、疲労困憊運動が必須条件となる海馬 GL は疲労困憊運動を基盤とした NA によるグリコーゲン合成促進作用が奏功することで実現した可能性が考えられる。今後、NA や PTG の安静時レベルなどを検討することで、海馬 GL の背景にあるメカニズムを明らかにしていく必要がある。

また、本研究課題から GL による筋グリコーゲン量の増加には高糖質食が必須であることも明らかとなった。GL による筋グリコーゲン量の増加は食餌中の糖質濃度に依存するだけでなく (研究課題 2-2、図 9A)、高糖質食 + 運動群は高糖質食 + 安静群と比べ筋グリコーゲン量は有意な高値を示した (研究課題 2-3、図 11A)。しかし、通常食を用いた本研究課題においては運動群 (疲労困憊 + 中強度群および疲労困憊群) と安静群との間に筋グリコーゲンの有意な差は見られなかったことから、GL による筋グリコーゲン量増加には高糖質食が必須であることが明らかになった。

これらのことから、海馬 GL は通常食と疲労困憊運動を組み合わせることで実現可能であることが明らかとなった。

## 5. 要約

研究課題 2-4 では海馬を標的とした GL の開発にむけて、海馬 GL に必須である運動（疲労困憊運動とその後 3 日の中強度運動および安静）の詳細な条件を明らかにするために、運動の組み合わせの変更が海馬グリコーゲン量に及ぼす影響を検討した。その結果、疲労困憊運動を行った 2 群（疲労困憊運動＋中強度運動、疲労困憊運動のみ）の海馬グリコーゲン量が安静群と比べ高値を示し、筋、肝および他の脳部位では変化が見られなかった。これにより、海馬特異的にグリコーゲン量を増加させる海馬 GL には疲労困憊運動が必須であることが明らかとなった。

## 第9章 新奇物体再認テストを用いてパターン分離能を評価する高類似度課題の確立(研究課題3-1)

### 1. 目的

海馬 GL が認知機能を高めるかどうかを明らかにするためには、海馬 GL 直後に認知機能を測定できる行動実験を用いる必要がある。これまで脳グリコーゲンと認知機能の関連を検討した先行研究では様々な行動実験が用いられてきたが、その多くの実験で必須条件となる絶食・絶水や餌による報酬は脳グリコーゲン量への影響が危惧される。また、海馬機能の評価に最も用いられているモリス水迷路も認知課題の実施にトレーニングが必要であることや、認知機能の評価に游泳運動能力も反映することから、GL による海馬機能への影響を評価するには適していないことが示唆される。

そこで、本研究では齧歯類の認知機能を最短1日で測定でき、多くの行動実験で必須条件となる絶食・絶水や餌などの行動誘発のための強化因子や報酬などが不要であり、齧歯類の新奇性を好む自発的な行動を利用した「新奇物体再認テスト (NOR)」を用いて、海馬 GL を施したラットの認知機能を検討する。2つの異なるオブジェクトの識別率を評価するこのテストにおいて、類似度の高いオブジェクトを用いることで難易度の高い認知課題を設定することが可能であることが近年報告され、さらに、この類似度の高い情報を見分ける「パターン分離」能力は海馬特異的な機能であることから、難易度の高いオブジェクトを用いた高類似度の課題設定が可能となれば、海馬 GL による海馬機能への効果を評価する行動実験として最適であることが考えられる。そこで、NOR の高類似度課題を確立するため、難易度が高く、ラットが違いを識別できないオブジェクトを探索した。

2. 方法
  - 2-1. 被験動物および飼育条件
  - 2-2. 群分け
  - 2-3. 新奇物体再認テスト (NOR)
  - 2-4. 統計処理
3. 結果
  - 3-1. 各オブジェクトにおける新奇物体識別率
4. 考察
5. 要約

## 第10章 海馬 GL が海馬の司るパターン分離能に及ぼす影響(研究課題3-2)

### 1. 目的

研究課題3-1では新奇物体再認テストで高類似度課題を設定するために適したオブジェクトを検討した結果、低類似度課題と高類似度課題の2つの課題を設定することに成功した。先行研究でも、新奇物体再認テストの高類似度課題と低類似度課題を用いて、長期間の輪回し運動効果を検証しており、運動群が安静群と比べ、高類似度課題で高い識別率を示すことが明らかになっていることから (Bolz et al., 2015)、高類似度課題を用いることで運動による認知機能向上効果を検出できることが想定される。また、長期間の運動トレーニングは海馬のグリコーゲン量を増加させ、海馬機能を高めることが報告されていることから (Matsui et al., 2012; Shima et al., 2016)、海馬 GL により海馬グリコーゲン量が増加することで海馬が担う記憶能が向上する可能性がある。したがって、研究課題2-2では、海馬グリコーゲン量を増加させる海馬 GL が海馬特異的な機能であるパターン分離能に及ぼす効果を、新奇物体再認テストの高類似度課題を用いて検討した。

### 2. 方法

- 2-1. 被験動物および飼育条件
- 2-2. 群分け
- 2-3. 走行学習
- 2-4. 海馬 GL
- 2-5. 新奇物体再認テスト
- 2-6. 統計処理

3. 結果
  - 3-1. 低類似度課題
    - 3-1-1. 総探索行動量
    - 3-1-2. 新奇物体識別率
  - 3-2. 高類似度課題
    - 3-2-1. 総探索行動量
    - 3-2-2. 新奇物体識別率
4. 考察
5. 要約



## 第11章 総合討論

運動は末梢のみならず脳へも作用し、持久性能のみならず認知機能を高めることはヒトや齧歯類を対象とした多くの研究で報告されているが (Kramer et al., 1999; van Praag et al., 1999; Inoue et al., 2014)、運動の期間、栄養や休養の摂り方などを調整することにより、短期間で効率的に認知機能をも高めるコンディショニング法を開発するための研究は未だに存在しない。しかし、近年、持久性能と認知機能が相関することが明らかとなり (Hillman et al., 2008; Hyodo et al., 2016; Suwabe et al., 2017a)、持久性能向上に寄与する GL が認知機能をも高めるコンディショニング法となり得る可能性がある。GL の基盤となる疲労困憊運動後のグリコーゲン超回復は筋のみならず脳でも生じることや (Matsui et al., 2012)、海馬可塑性を高める運動トレーニングモデルは脳の中でも記憶を司る海馬のグリコーゲン量を増加させることから、脳の中でも海馬は運動に対するグリコーゲン代謝適応を引き起こしやすい脳部位であることが示唆され、海馬 GL の開発が期待される。脳グリコーゲンは持久性能のみならず認知機能に関与し、海馬におけるグリコーゲンは記憶形成において重要な役割を担うことから、海馬 GL を開発することができれば海馬が担う記憶能が向上する可能性がある。

以上のことから、本研究では GL は筋だけでなく脳にも奏功し、なかでも海馬のグリコーゲン量を増加させることで海馬に関連した記憶能を向上させると想定し、GL が海馬を標的とした認知機能をも高めるコンディショニングになりうるかどうかを明らかにすることを目的とした。これを明らかにするために、まずは1週間の GL のラットモデルを用いて、脳グリコーゲン量への影響を検討した (研究課題1)。次に、海馬 GL を開発するために、

GL の 2 大要素である運動と高糖質食の観点から海馬を標的としたよりシンプルな GL 条件を探索した (研究課題 2)。最後に、研究課題 2 で確立した海馬 GL がパターン分離能へ及ぼす効果を検討した (研究課題 3)。

## 1. GL が脳グリコーゲン量に及ぼす影響

本研究では GL が脳へも奏功するかどうかを解明する第一歩として、GL のラットモデルを用いて脳グリコーゲン量へ及ぼす影響を検討した (研究課題 1)。このモデルは、持久性アスリートが試合前約 1 週間に行うことで筋グリコーゲン量を増加させ、持久性を高める GL を模したものであり (Bergström et al., 1967; Sherman et al., 1981)、激運動に加え、更なる運動と高糖質食を調整することで試合当日の筋グリコーゲン量を増加させる唯一のラットモデルである (Shinohara et al., 2010)。このモデルでは GL の運動様式として強制水泳運動を用いているが、本研究では、疲労困憊運動後の脳グリコーゲン減少および超回復が生じることを確認しているトレッドミル走運動を採用した。

まず、GL プロトコルの妥当性を検証する上で、持久性向上効果と筋グリコーゲン量増加が見られるかどうかを検討した。特に、持久性向上については GL のラットモデルで検討した研究はこれまでになく、GL の前提条件として持久性向上効果がラットモデルでも確認できるかどうかは重要な点であったが、ヒトの GL モデルと同様に本研究で用いた GL により持久性向上は有意に向上し (図 3)、筋グリコーゲン量は先行研究同様に有意に増加することを初めて明らかにした (図 3)。特に、本研究における筋グリコーゲン増加率は 79% であり、GL ラットモデルを確立した Shinohara ら (2010) の 24% を大きく上回り、ヒトの GL モデルにおける増加率 (80%)

に匹敵する効果が得られたことから (Sherman et al., 1981; Costill, 1988)、ヒトに近い筋グリコーゲン増加率が得られる GL モデルの確立に成功した。さらに、この GL モデルが脳にも奏功するかどうかを検討したところ、脳では海馬と視床下部のグリコーゲン量を有意に増加させることが初めて明らかになった (図 3)。これらのことから、本研究の仮説を検証するための脳 GL モデルが確立できたと言える。

## 2. 海馬特異的に作用する“海馬 GL”の条件探索

GL は 1 週間のコンディショニング法であり、高糖質食摂取と複数の運動条件を組み合わせることで、目的とする試合に向けて筋グリコーゲン貯蔵量を増加させ、持久性を高めることから、古くから多くの持久性アスリートが実践している。GL が持久性能力のみならず認知機能に対して向上効果を示した場合、GL の新たな可能性として、アスリートのみならず、試験を控える受験生や、重要なプレゼンテーション前の社会人など、高い認知機能発揮が要求される様々な場面にむけたコンディショニング法になり得ることが期待される。持久性を高める従来の GL は、筋グリコーゲンが激しい運動により枯渇し、その後の糖質摂取により超回復することから、その超回復を 1 週間持続させる方法として高糖質食と数日間の運動が必須条件として組み合わせられているが、認知機能を高める GL が従来の GL プロトコルと同様の条件が必須かどうかを明らかにする必要がある、本研究ではこれを明らかにすることで、認知機能が要求される様々な場面への汎用性が高い新たな GL の提案を目指した。

脳のなかでも海馬は認知機能、とりわけ学習や記憶を司る脳部位であり、同様に認知機能を担う皮質と比べ、運動トレーニングにより構造的、代謝的、

さらには機能的にも大きく変化する可塑性の高い脳部位として知られている。実際に、海馬に貯蔵されるグリコーゲンは長期記憶形成に必須であることが明らかとなっており、長期間の運動トレーニングにより安静時のグリコーゲン量が増加し、それに伴い海馬機能の一つである空間認知機能が高まることが報告されていることから、海馬を標的とした認知機能を高める新たな短期間のコンディショニング法として海馬 GL への期待が高まる。そこで、研究課題 2 では、海馬特異的にグリコーゲンが増加する GL プロトコルの開発が可能かどうか、またその必須条件を明らかにするために、従来の GL の構成要素である高糖質食と運動の観点から検討した。

GL は約 1 週間のコンディショニングモデルであり、GL の基盤となる一過性激運動後の筋グリコーゲン超回復は運動後 24 時間で生じるが、海馬では運動後 6 時間で生じることから、GL においても筋より早期に海馬グリコーゲン量増加がピークに達する可能性があるため、GL 開始後 5、6、7 日目のグリコーゲン量を検討した（研究課題 2-1）。その結果、筋および海馬グリコーゲン量は 5 日目から 7 日目まで有意に増加し、7 日で最大値に達した（図 5）。先行研究では 7 日間の GL の 4 日目でも筋グリコーゲン量の増加が見られていたことから、本実験で見られた 5 日目からの増加は先行研究と一致しており、筋と海馬との間に違いは見られないことが明らかとなった。この結果から、疲労困憊運動により生じる筋および海馬グリコーゲン超回復は、その後の高糖質食摂取と更なる運動によって、その増加を GL 期間中維持している可能性が示唆された。将来的に認知機能を高める海馬 GL の応用性を検討するにあたり、より短期間での海馬 GL の可能性を検討する上で有意義な知見である。研究課題 2 では、従来の 1 週間の GL プロトコルを基に、その構成要素が同様に海馬 GL に必須かどうかを検討すること

を目的としているため、従来の GL と同様の 1 週間のプロトコルを用いてこれ以降の条件検討を行った。

次に、高糖質食の影響を検討するために、異なる糖質濃度の食餌(5%, 35%, 70%)と運動(疲労困憊運動に加え、更なる運動と休養)を行う 1 週間の GL を行った(研究課題 2-2)。本実験では糖質摂取量の違いがグリコーゲン量に及ぼす影響を検討するため、栄養学領域の実験手法であるセルロースパウダーを用いた摂取カロリー統制を参考にし (Usami et al., 1982; Luo et al., 2016)、飼料 100 g あたりの摂取カロリーを同等にし(表 2)、さらに、タンパク質からのグルコース生成の影響を排除するためにも各食餌群のタンパク質含有率は 25% に統一した(表 3)。その結果、各群の総糖質摂取量は食餌中の糖質濃度依存的に増加したのに対し摂取カロリーに差は見られず、血糖値への影響もないことを確認した(図 7)。これまでの実験でグリコーゲン量の増加が見られた筋、海馬、視床下部は異なる糖質濃度の食餌群間でグリコーゲン量に有意な差は見られなかったが、肝臓では 70% の低糖質食群が 5% の高糖質食群に対して有意な高値を示した(図 8)。筋および肝臓では、総糖質摂取量とグリコーゲン量との間に有意な正の相関関係が見られたのに対し、脳ではいずれの部位でも相関は認められなかった(図 9)。これらの結果から、脳は末梢組織と異なりグリコーゲン合成は食餌中の糖質濃度に影響を受けないことから、海馬 GL には高糖質食を用いる必要がないことが示唆された。さらに、研究課題 2-3 では、GL 中の運動(疲労困憊運動に加え、更なる運動)の影響を検討した。その結果、運動は海馬グリコーゲン量を増加させるための必須要素であることも明らかとなった(図 11)。

研究課題 2-1、2-2、2-3 の結果から、海馬 GL には運動が重要であり、高糖質食は必須でないことが示唆されたことから、通常食下で GL 中の

運動条件を検討することで海馬特異的にグリコーゲン量を増加させることが可能かどうかを研究課題 2-4 で検討した。GL 中の運動は初日の疲労困憊運動 (20 m/min, 疲労困憊に至るまで)、その後 3 日間の中強度運動 (20 m/min, 30 min/day)、続く 3 日間の休養であり、これらの要素の有無が海馬グリコーゲン量の増加に及ぼす影響を検討したところ、疲労困憊運動を含む運動群 (EE+Mod 群、EE 群) でのみ、海馬グリコーゲンが有意な高値を示した (図 13)。この時、海馬以外の部位ではグリコーゲン量の増加は見られなかったことから、GL における疲労困憊運動が海馬グリコーゲン量を増加させる必須要素であることが明らかとなった。Matsui ら (2012) は一過性の疲労困憊運動後の海馬グリコーゲン超回復は運動後 6 時間から生じ、24 時間後までその増加が保たれることを明らかにしているが (Matsui et al., 2012)、それ以降の海馬グリコーゲン動態を検討するには至っていない。GL の初日には、同様の疲労困憊運動を行っていることから、海馬 GL 後 7 日目のグリコーゲン量の増加は、初日の疲労困憊運動により生じたグリコーゲン超回復が維持された結果である可能性が考えられる。これは、一過性疲労困憊運動後 6 時間の海馬グリコーゲン増加率が 33%であったのに対し、GL 後 7 日目では 13%の増加率であったことから推察される。

海馬特異的にグリコーゲンが増加するメカニズムは今後検討する必要があるが、NA を介したグリコーゲン合成機構が関与する可能性がある。NA 作動性神経は高強度や長時間運動時に活性化するだけでなく (Pagliari et al., 1995; Ohiwa et al., 2006; Kitaoka et al., 2010; Wang et al., 2013)、疲労困憊運動によるグリコーゲン超回復は海馬において海馬と皮質のグリコーゲン超回復が一過性疲労困憊運動による脳グリコーゲン減少と NA の代謝産物である MHPG の増加は負の相関関係にあることから (Matsui et al., 2011)、脳グ

リコーゲン減少には NA が関与することが示唆されており、さらにこの NA は短時間では脳グリコーゲン分解に作用し、長時間では PTG (protein targeting to glycogen) の合成を介してグリコーゲン合成を促進することが培養実験で証明されていることから (Sorg et al., 1992; Allaman et al., 2000; Magistretti, 2006)、疲労困憊運動が必須条件となる海馬 GL は疲労困憊運動を基盤とした NA によるグリコーゲン合成促進作用が奏功することで実現した可能性が考えられる。今後、NA や PTG の安静時レベルなどを検討することで、海馬 GL の背景にあるメカニズムを明らかにしていく必要がある。

以上、研究課題 2 の結果から、1 週間の通常食と疲労困憊運動を含む運動を組み合わせた GL は海馬のグリコーゲン量特異的に増加させたことから、海馬 GL モデルの確立に成功し、疲労困憊運動がその必須要素であることが明らかとなった。

### 3. 海馬 GL 法が認知機能に及ぼす効果

### 4. 本研究課題の意義と今後の課題

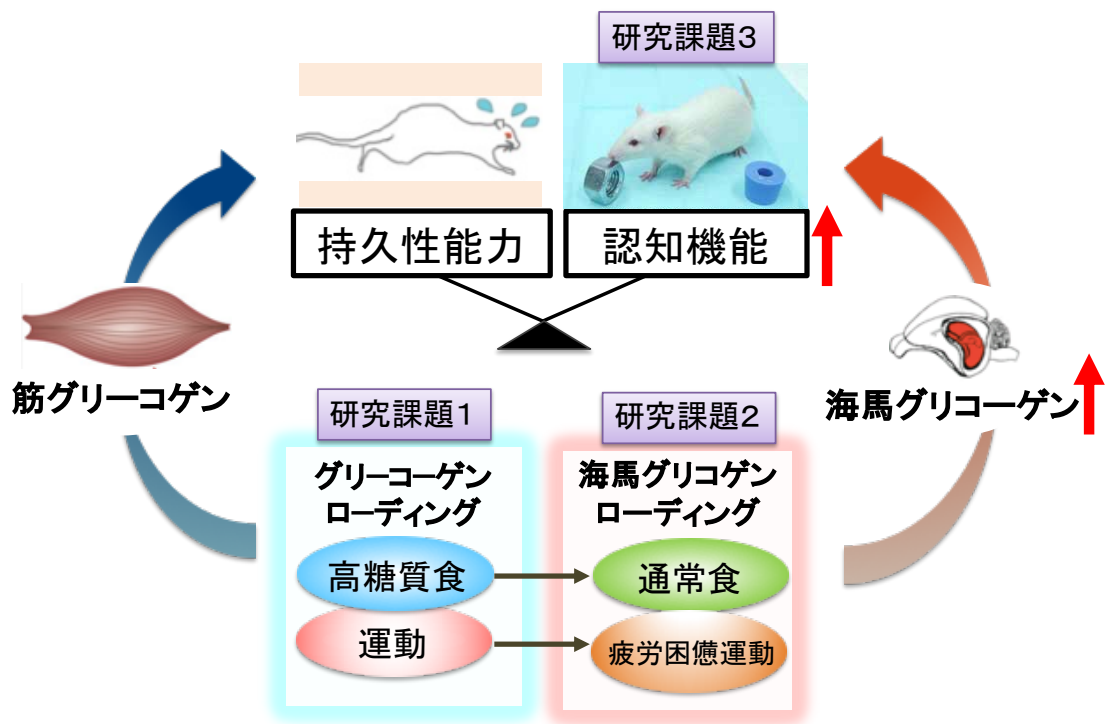


図 14 本研究のまとめ

本研究の結果から、従来の GL を基盤に開発した海馬 GL が海馬機能の一つであるパターン分離能を高めるコンディショニングとして有効である可能性が示唆された。



## 第12章 総括

本研究では GL が脳にも奏功するかどうかを明らかにすることを目的とした。これを明らかにするために、GL の動物モデルを用いて、GL が脳グリコーゲン量に及ぼす影響を検討した（研究課題1）。さらに、研究課題1でグリコーゲン量の増加が見られた海馬は認知に関わることから、海馬を標的とした海馬 GL の開発にむけて、GL の構成要素である高糖質食や運動の条件を調整することで、海馬特異的にグリコーゲン量を増加させることが可能かどうか検討した（研究課題2）。最後に、研究課題2で開発した海馬 GL が認知機能に及ぼす効果を検討した（研究課題3）。

### 【研究課題1】 GL が脳グリコーゲン量に及ぼす影響

筋グリコーゲン量を増加させる高糖質食と運動（疲労困憊運動、3日間の中強度運動、3日間の休養）を組み合わせた1週間の GL は筋のみならず海馬および視床下部のグリコーゲン量を増加させることが明らかになり、脳 GL モデルの確立に成功した。

### 【研究課題2】 海馬を標的としたよりシンプルな GL 条件の開発

1) 研究課題2-1：GL 期間中の海馬グリコーゲン動態の検討  
GL 期間中に海馬グリコーゲン量が最も増加するタイミングを検討したところ、筋同様に海馬でもグリコーゲン開始後7日目が最も高い値を示すことが明らかとなった。

2) 研究課題 2-2 : GL における高糖質食が海馬グリコーゲン量に及ぼす影響

GL による海馬グリコーゲン量の増加に高糖質食は必須でないことが明らかとなった。筋では GL 期間中の糖質摂取量に依存してグリコーゲン量が増加したことから、末梢と中枢ではグリコーゲン合成機構が異なる可能性が示唆された。

3) 研究課題 2-3 : GL における運動が海馬グリコーゲン量に及ぼす影響

GL による海馬グリコーゲン量の増加に運動（疲労困憊運動、3 日間の中強度運動、3 日間の休養）は必須であることが明らかとなった。

4) 研究課題 2-4 : 海馬グリコーゲン量増加に必要な運動条件の検討

通常食を用いた GL において、海馬グリコーゲン量特異的に増加させる運動条件は疲労困憊運動であることが明らかになった。

**【研究課題 3】海馬 GL がパターン分離能に及ぼす効果**

1) 研究課題 3-1 : 新奇物体再認テストを用いてパターン分離能を評価する高類似度課題の確立

2) 研究課題 3-2 : 海馬 GL が海馬の司るパターン分離能に及ぼす効果

本研究により、高糖質食と運動を組み合わせた GL は筋のみならず海馬と視床下部のグリコーゲン量を増加させ、GL の構成要素の一つである疲労困憊運動が海馬特異的にグリコーゲン量を増加させる海馬 GL の必須条件と

して同定された。さらに、海馬 GL が海馬の担う認知機能の一種であるパターン分離能を高めることを明らかにした。この成果は、従来の GL を基盤に開発した海馬 GL が海馬機能の一つであるパターン分離能を高めるコンディショニングとして有効である可能性を示唆する。

## 謝辞

本稿を終えるにあたり、終始丁寧なご指導とご高閲を賜りました主指導教員（副査）の松井崇助教に対し深謝致します。また、ご多忙の中、主査を引き受けてくださいました麻見直美准教授、副査を引き受けてくださいました大森肇教授、専攻外副査をご担当くださった一谷幸男教授にも、貴重なご指導とご助言を賜りましたことを深く感謝致します。さらに、本研究に際し、ご指導いただいた征矢英昭教授をはじめ、征矢研究室の皆様にご心からお礼申し上げます。最後に、研究の糧となったすべての実験動物に対し、深い感謝と追悼の意を表します。

## 参考文献

- Ahlborg B, Bergstrom J, Ekelund L, Hultman E.** Muscle glycogen and muscle electrolytes during prolonged physical exercise. *Acta Physiol. Scand.* 70: 129–142, 1967.
- Akirav I, Sandi C, Richter-Levin G.** Differential activation of hippocampus and amygdala following spatial learning under stress. *Eur. J. Neurosci.* 14: 719–725, 2002.
- Allaman I, Pellerin L, Magistretti PJ.** Protein targeting to glycogen mRNA expression is stimulated by noradrenaline in mouse cortical astrocytes. *Glia* 30: 382–391, 2000.
- Astrand P.** Diet and athletic performance. *Fed. Proc.* 26: 1772–1777, 1967.
- Bergersen L, Waerhaug O, Helm J, Thomas M, Laake P, Davies AJ, Wilson MC, Halestrap AP, Ottersen OP.** A novel postsynaptic density protein: the monocarboxylate transporter MCT2 is co-localized with delta-glutamate receptors in postsynaptic densities of parallel fiber-Purkinje cell synapses. *Exp. brain Res.* 136: 523–534, 2001.
- Bergström J, Hermansen L, Hultman E, Saltin B.** Diet, Muscle Glycogen and Physical Performance. *Acta Physiol. Scand.* 71: 140–150, 1967.
- Bergström J, Hultman E.** Muscle glycogen synthesis after exercise: an enhancing factor localized to the muscle cells in man. *Nature* 210: 309–310, 1966.

**Berron D, Schütze H, Maass A, Cardenas-Blanco A, Kuijf HJ, Kumaran D, Düzel E.** Strong Evidence for Pattern Separation in Human Dentate Gyrus. *J. Neurosci.* 36: 7569–7579, 2016.

**Bolz L, Heigle S, Bischofberger J.** Running Improves Pattern Separation during Novel Object Recognition. *Brain Plast.* 1: 129–141, 2015.

**Brown AM, Ransom BR.** Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia* 55: 1263–1271, 2007.

**Brown AM, Tekkök SB, Ransom BR.** Glycogen Regulation and Functional Role in Mouse White Matter. *J. Physiol.* 549: 501–512, 2003.

**Burghardt NS, Fenton A a, Dranovsky A.** Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *October* 472: 466–470, 2011.

**Byun K, Hyodo K, Suwabe K, Ochi G, Sakairi Y, Kato M, Dan I, Soya H.** Positive effect of acute mild exercise on executive function via arousal-related prefrontal activations: An fNIRS study. *Neuroimage* 98: 336–345, 2014.

**Cartee GD, Young DA, Sleeper MD, Zierath J, Wallberg-Henriksson H, Holloszy JO.** Prolonged increase in insulin-stimulated glucose transport in muscle after exercise. *Am. J. Physiol.* 256: E494–E499, 1989.

**Cataldo AM, Broadwell RD.** Cytochemical identification of cerebral glycogen and glucose-6-phosphatase activity under normal and experimental conditions. II. Choroid plexus and ependymal epithelia, endothelia and pericytes. *J. Neurocytol.* 15: 511–24, 1986.

**Christensen EH, Hansen O.** Arbeitsfähigkeit und Ernährung. *Skand. Arch. Physiol.* 81: 160–171, 1939.

**Clelland CD, Choi M, Romberg C, Clemenson Jr. GD, Fragniere A, Tyers P, Jessberger S, Saksida LM, Barker RA, Gage FH, Bussey TJ.** A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science.* 325: 210–213, 2009.

**Colcombe SJ, Kramer AF, Erickson KI, Scalf P, McAuley E, Cohen NJ, Webb A, Jerome GJ, Marquez DX, Elavsky S.** Cardiovascular fitness, cortical plasticity, and aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 3316–3321, 2004.

**Conlee RK, Hammer RL, Winder WW, Bracken ML, Nelson AG, Barnett DW.** Glycogen repletion and exercise endurance in rats adapted to a high fat diet. *Metabolism* 39: 289–294, 1990.

**Costill DL.** Carbohydrates for Exercise: Dietary Demands for Optimal Performance. *Int. J. Sports Med.* 09: 1–18, 1988.

**Costill DL, Sherman WM, Fink WJ, Maresh C, Witten M, Miller JM.** The role of dietary carbohydrates in muscle glycogen resynthesis after strenuous running. *Am. J. Clin. Nutr.* 34: 1831–6, 1981.

**Dringen R, Hamprecht B.** Glucose, Insulin, and Insulin-Like Growth Factor I Regulate the Glycogen Content of Astroglia-Rich Primary Cultures. *J. Neurochem.* 58: 511–517, 1992.

**Duran J, Saez I, Gruart A, Guinovart JJ, Delgado-García JM.** Impairment in long-term memory

formation and learning-dependent synaptic plasticity in mice lacking glycogen synthase in the brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 33: 550–556, 2013.

**Erickson KI, Prakash RS, Voss MW, Chaddock L, Morris KS, White SM, Wójcicki TR, McAuley E, Kramer AF.** Aerobic fitness is associated with hippocampal volume in elderly humans. *Hippocampus* 19: 1030–1039, 2009.

**Erickson KI, Voss MW, Prakash RS, Basak C, Szabo A, Chaddock L, Kim JS, Heo S, Alves H, White SM, Wojcicki TR, Mailey E, Vieira VJ, Martin SA, Pence BD, Woods JA, McAuley E, Kramer AF.** Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108: 3017–3022, 2011.

**Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH.** Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4: 1313–1317, 1998.

**van Hagen BTJ, van Goethem NP, Lagatta DC, Prickaerts J.** The object pattern separation (OPS) task: A behavioral paradigm derived from the object recognition task. *Behav. Brain Res.* 285: 44–52, 2015.

**Hamai M, Minokoshi Y, Shimazu T.** L-Glutamate and insulin enhance glycogen synthesis in cultured astrocytes from the rat brain through different intracellular mechanisms. *J. Neurochem.* 73: 400–407, 1999.

**Hansen PA, Nolte LA, Chen MM, Holloszy JO.** Increased GLUT-4 translocation mediates enhanced



insulin sensitivity of muscle glucose transport after exercise. *J. Appl. Physiol.* 85: 1218–1222, 1998.

**Hasegawa H, Piacentini MF, Sarre S, Michotte Y, Ishiwata T, Meeusen R.** Influence of brain catecholamines on the development of fatigue in exercising rats in the heat. *J. Physiol.* 586: 141–149, 2008.

**Havrankova J, Roth J, Brownstein M.** Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature* 272: 827–829, 1978.

**Hawley JA, Palmer GS, Noakes TD.** Effects of 3 days of carbohydrate supplementation on muscle glycogen content and utilisation during a 1-h cycling performance. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 75: 407–12, 1997a.

**Hawley JA, Schabert EJ, Noakes TD, Dennis SC.** Carbohydrate-loading and exercise performance. An update. *Sports Med.* 24: 73–81, 1997b.

**Hayashi T, Wojtaszewski JF, Goodyear LJ.** Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 273: E1039-51, 1997.

**Heni M, Hennige AM, Peter A, Siegel-Axel D, Ordelheide A-M, Krebs N, Machicao F, Fritsche A, Häring H-U, Staiger H.** Insulin promotes glycogen storage and cell proliferation in primary human astrocytes. *PLoS One* 6: e21594, 2011.

**Hermansen L, Hultman E, Saltin B.** Muscle Glycogen during Prolonged Severe Exercise. *Acta Physiol.*

Scand. 71: 129–139, 1967.

**Hillman CH, Erickson KI, Kramer AF.** Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition. *Nat Rev Neurosci.* 9: 58–65, 2008.

**Hoffmann K, Sobol NA, Frederiksen KS, Beyer N, Vogel A, Vestergaard K, Brændgaard H, Gottrup H, Lolk A, Wermuth L, Jacobsen S, Laugesen LP, Gergelyffy RG, Høgh P, Bjerregaard E, Andersen BB, Siersma V, Johannsen P, Cotman CW, et al.** Moderate-to-high intensity physical exercise in patients with Alzheimer’s disease: A randomized controlled trial. *J. Alzheimer’s Dis.* 50: 443–453, 2016.

**Hyodo K, Dan I, Kyutoku Y, Suwabe K, Byun K, Ochi G, Kato M, Soya H.** The association between aerobic fitness and cognitive function in older men mediated by frontal lateralization. *Neuroimage* 125: 291–300, 2016.

**Ignacio PC, Baldwin B a, Vijayan VK, Tait RC, Gorin F a.** Brain isozyme of glycogen phosphorylase: immunohistological localization within the central nervous system. *Brain Res.* 529: 42–9, 1990.

**Inoue K, Hanaoka Y, Nishijima T, Okamoto M, Chang H, Saito T, Soya H.** Long-term Mild Exercise Training Enhances Hippocampus-dependent Memory in Rats. *Int. J. Sports Med.* 36: 280–285, 2014.

**Inoue N, Matsukado Y, Goto S, Miyamoto E.** Localization of Glycogen Synthase in Brain. *J. Neurochem.* 50: 400–405, 1988.

**Ivy JL, Kuo CH.** Regulation of GLUT4 protein and glycogen synthase during muscle glycogen synthesis after exercise. *Acta Physiol. Scand.* 162: 295–304, 1998.

**Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH.** More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386: 493–495, 1997.

**Kitaoka R, Fujikawa T, Miyaki T, Matsumura S, Fushiki T, Inoue K.** Increased noradrenergic activity in the ventromedial hypothalamus during treadmill running in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. 56: 185–190, 2010.

**Koizumi J, Shiraishi H.** Glycogen accumulation in astrocytes of the striatum and pallidum of the rabbit following administration of psychotropic drugs. *J. Electron Microsc. (Tokyo)*. 19: 182–187, 1970a.

**Koizumi J, Shiraishi H, M1nei S.** Ultrastructural appearance of glycogen in neuron and astrocyte of the human cerebral cortex adjacent to brain tumors. *J. Electron Microsc. (Tokyo)*. 19: 355–361, 1970b.

**Kong J, Shepel PN, Holden CP, Mackiewicz M, Pack AI, Geiger JD.** Brain glycogen decreases with increased periods of wakefulness: implications for homeostatic drive to sleep. *J. Neurosci.* 22: 5581–7, 2002.

**Kramer AF, Hahn S, Cohen NJ, Banich MT, McAuley E, Harrison CR, Chason J, Vakil E, Bardell L, Boileau RA, Colcombe A.** Ageing, fitness and neurocognitive function. *Nature* 400: 418–419, 1999.

**Kujach S, Byun K, Hyodo K, Suwabe K, Fukuie T, Laskowski R, Dan I, Soya H.** A transferable

high-intensity intermittent exercise improves executive performance in association with dorsolateral prefrontal activation in young adults. *Neuroimage* 169: 117–125, 2018.

**Lee MC, Okamoto M, Liu YF, Inoue K, Matsui T, Nogami H, Soya H.** Voluntary resistance running with short distance enhances spatial memory related to hippocampal BDNF signaling. *J. Appl. Physiol.* 113: 1260–6, 2012.

**Luo T, Miranda-garcia O, Adamson A, Hamilton-reeves J, Sullivan DK, Kinchen JM, Shay NF.** Consumption of Walnuts in Combination with Other Whole Foods Produces Physiologic , Metabolic , and Gene Expression Changes in Obese C57BL / 6J High-Fat – Fed Male Mice. *J. Nutr.* 146: 1641–1650, 2016.

**Magistretti PJ.** Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *J. Exp. Biol.* 209: 2304–2311, 2006.

**Magistretti PJ, Morrison JH.** Noradrenaline- and vasoactive intestinal peptide-containing neuronal systems in neocortex: functional convergence with contrasting morphology. *Neuroscience* 24: 367–378, 1988.

**Matsui T, Ishikawa T, Ito H, Okamoto M, Inoue K, Lee M chul, Fujikawa T, Ichitani Y, Kawanaka K, Soya H.** Brain glycogen supercompensation following exhaustive exercise. *J. Physiol.* 590: 607–616, 2012.

**Matsui T, Omuro H, Liu Y-F, Soya M, Shima T, McEwen BS, Soya H.** Astrocytic glycogen-derived lactate fuels the brain during exhaustive exercise to maintain endurance capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114: 6358–6363, 2017.

**Matsui T, Soya S, Okamoto M, Ichitani Y, Kawanaka K, Soya H.** Brain glycogen decreases during prolonged exercise. *J. Physiol.* 589: 3383–3393, 2011.

**McDonald RJ, White NM.** A triple dissociation of memory systems: hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behav. Neurosci.* 107: 3–22, 1993.

**Morris R.** Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods* 11: 47–60, 1984.

**Nelson SR, Schulz DW, Passonneau J V., Lowry OH.** Control of Glycogen Levels in Brain. *J. Neurochem.* 15: 1271–1279, 1968.

**Newman LA, Korol DL, Gold PE.** Lactate Produced by Glycogenolysis in Astrocytes Regulates Memory Processing. *PLoS One* 6: e28427, 2011.

**O' Keefe J DJ.** Short Communications The hippocampus as a spatial map . Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.* 34: 171–175, 1971.

**Ohiwa N, Chang H, Saito T, Onaka T, Fujikawa T, Soya H.** Possible inhibitory role of prolactin-releasing peptide for ACTH release associated with running stress. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292: R497–R504, 2007.

**Ohiwa N, Saito T, Chang H, Omori T, Fujikawa T, Asada T, Soya H.** Activation of A1 and A2

noradrenergic neurons in response to running in the rat. *Neurosci. Lett.* 395: 46–50, 2006.

**Okamoto M, Hojo Y, Inoue K, Matsui T, Kawato S, McEwen BS, Soya H.** Mild exercise increases dihydrotestosterone in hippocampus providing evidence for androgenic mediation of neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109: 13100–5, 2012.

**Öz G, Kumar A, Rao JP, Kodl CT, Chow L, Eberly LE, Seaquist ER.** Human brain glycogen metabolism during and after hypoglycemia. *Diabetes* 58: 1978–1985, 2009.

**Pagliari R, Peyrin L.** Norepinephrine release in the rat frontal cortex under treadmill exercise: a study with microdialysis. *J. Appl. Physiol.* 78: 2121–2130, 1995.

**Passonneau J V, Lauderdale VR.** A comparison of three methods of glycogen measurement in tissues. *Anal. Biochem.* 60: 405–412, 1974.

**Pellegrini G, Rossier C, Magistretti PJ, Martin JL.** Cloning, localization and induction of mouse brain glycogen synthase. *Mol. Brain Res.* 38: 191–199, 1996.

**Pellerin L, Magistretti PJ.** Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 10625–10629, 1994.

**Pellerin L, Magistretti PJ.** Sweet sixteen for ANLS. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32: 1152–66, 2012.

**Petersen RC, Jack CR, Xu YC, Waring SC, O'Brien PC, Smith GE, Ivnik RJ, Tangalos EG, Boeve BF, Kokmen E.** Memory and MRI-based hippocampal volumes in aging and AD. *Neurology* 54: 581–

587, 2000.

**Petit J-M, Burlet-Godinot S, Magistretti PJ, Allaman I.** Glycogen metabolism and the homeostatic regulation of sleep. *Metab. Brain Dis.* 30: 263–279, 2015.

**Van Petten C.** Relationship between hippocampal volume and memory ability in healthy individuals across the lifespan: Review and meta-analysis. *Neuropsychologia* 42: 1394–1413, 2004.

**Phelps CH.** Barbiturate-induced glycogen accumulation in brain. An electron microscopic study. *Brain Res.* 39: 225–234, 1972.

**Pierre K, Magistretti PJ, Pellerin L.** MCT2 is a major neuronal monocarboxylate transporter in the adult mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 22: 586–595, 2002.

**Pitsiladis YP, Maughan RJ.** The effects of exercise and diet manipulation on the capacity to perform prolonged exercise in the heat and in the cold in trained humans. *J. Physiol.* 517: 919–930, 1999.

**van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH.** Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 13427–31, 1999.

**Price TB, Rothman DL, Taylor R, Avison MJ, Shulman GI, Shulman RG.** Human muscle glycogen resynthesis after exercise: insulin-dependent and -independent phases. *J. Appl. Physiol.* 76: 104–111, 1994.

**Reagh ZM, Yassa MA.** Object and spatial mnemonic interference differentially engage lateral and medial entorhinal cortex in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111: E4264-4273, 2014.

**Sahay A, Scobie KN, Hill AS, O'Carroll CM, Kheirbek MA, Burghardt NS, Fenton AA, Dranovsky A, Hen R.** Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature* 472: 466–470, 2011.

**Saitoh S, Shimomura Y, Suzuki M.** Effect of a high-carbohydrate diet intake on muscle glycogen repletion after exercise in rats previously fed a high-fat diet. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 66: 127–133, 1993.

**Saitoh S, Tasaki Y, Tagami K, Suzuki M.** Muscle glycogen repletion and pre-exercise glycogen content: effect of carbohydrate loading in rats previously fed a high fat diet. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 68: 483–488, 1994.

**Sherman W, Costill D, Fink W, Miller J.** Effect of Exercise-Diet Manipulation on Muscle Glycogen and Its Subsequent Utilization During Performance. *Int. J. Sports Med.* 2: 114–118, 1981.

**Shima T, Takashi M, Jesmin S, Okamoto M, Soya M, Inoue K, Liu Y-F, Torres-Aleman I, McEwen BS, Soya H.** Moderate exercise ameliorates dysregulated hippocampal glycometabolism and memory function in a rat model of type 2 diabetes. *Diabetologia* 60: 597–606, 2016.

**Shinohara A, Takakura J, Yamane A, Suzuki M.** Effect of the classic 1-week glycogen-loading regimen on fat-loading in rats and humans. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo).* 56: 299–304, 2010.



**Shulman RG, Bloch G, Rothman DL.** In vivo regulation of muscle glycogen synthase and the control of glycogen synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92: 8535–8542, 1995.

**Sorg O, Magistretti PJ.** Vasoactive intestinal peptide and noradrenaline exert long-term control on glycogen levels in astrocytes: blockade by protein synthesis inhibition. *J. Neurosci.* 12: 4923–4931, 1992.

**Sotelo C, Palay SL.** The fine structure of the lateral vestibular nucleus in the rat. *J. Cell Biol.* 36: 151–179, 1968.

**Soya H, Nakamura T, Deocaris CC, Kimpara A, Iimura M, Fujikawa T, Chang H, McEwen BS, Nishijima T.** BDNF induction with mild exercise in the rat hippocampus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358: 961–967, 2007.

**Squire LR.** The Legacy of Patient H.M. for Neuroscience. *Neuron* 61: 6–9, 2009.

**Stewart KJ, Bacher AC, Turner K, Lim JG, Hees PS, Shapiro EP, Tayback M, Ouyang P.** Exercise and risk factors associated with metabolic syndrome in older adults. *Am. J. Prev. Med.* 28: 9–18, 2005.

**Suh SW, Bergher JP, Anderson CM, Treadway JL, Fosgerau K, Swanson RA.** Astrocyte Glycogen Sustains Neuronal Activity during Hypoglycemia: Studies with the Glycogen Phosphorylase Inhibitor CP-316,819 ([R-R\*,S\*]-5-Chloro-N-[2-hydroxy-3-(methoxymethylamino)-3-oxo-1-(phenylmethyl)propyl]-1H-indole-2-carboxamide). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 321: 45–50, 2007.

**Suwabe K, Hyodo K, Byun K, Ochi G, Fukuie T, Shimizu T, Kato M, Yassa MA, Soya H.** Aerobic

fitness associates with mnemonic discrimination as a mediator of physical activity effects: evidence for memory flexibility in young adults. *Sci. Rep.* 7: 5140, 2017a.

**Suwabe K, Hyodo K, Byun K, Ochi G, Yassa MA, Soya H.** Acute moderate exercise improves mnemonic discrimination in young adults. *Hippocampus* 27: 229–234, 2017b.

**Suzuki A, Stern SA, Bozdagi O, Huntley GW, Walker RH, Magistretti PJ, Alberini CM.** Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell* 144: 810–823, 2011.

**Suzuki M, Saitoh S, Yashiro M, Hariu J.** Dietary effects on liver and muscle glycogen repletion in exhaustively exercised rats: energy composition and type of complex carbohydrates. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. 30: 453–466, 1984.

**Swanson RA, Yu ACH, Chan PH, Sharp FR.** Glutamate Increases Glycogen Content and Reduces Glucose Utilization in Primary Astrocyte Culture. *J. Neurochem.* 54: 490–496, 1990.

**Swanson RA, Yu ACH, Sharp FR, Chan PH.** Regulation of Glycogen Content in Primary Astrocyte Culture: Effects of Glucose Analogues, Phenobarbital, and Methionine Sulfoximine. *J. Neurochem.* 52: 1359–1365, 1989.

**Tsacopoulos M, Magistretti PJ.** Metabolic coupling between glia and neurons. *J. Neurosci.* 16: 877–85, 1996.

**Usami M, Seino Y, Seino S, Takemura J, Nakahara H, Ikeda M, Imura H.** Effects of high protein

diet on insulin and glucagon secretion in normal rats. *J. Nutr.* 112: 681–5, 1982.

**Vilchez D, Ros S, Cifuentes D, Pujadas L, Vallès J, García-Fojeda B, Criado-García O, Fernández-Sánchez E, Medraño-Fernández I, Domínguez J, García-Rocha M, Soriano E, Rodríguez de Córdoba S, Guinovart JJ.** Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy. *Nat. Neurosci.* 10: 1407–1413, 2007.

**Wang J, Chen X, Zhang N, Ma Q.** Effects of exercise on stress-induced changes of norepinephrine and serotonin in rat hippocampus. *Chin. J. Physiol.* 56: 245–252, 2013.

**Yanagisawa H, Dan I, Tsuzuki D, Kato M, Okamoto M, Kyutoku Y, Soya H.** Acute moderate exercise elicits increased dorsolateral prefrontal activation and improves cognitive performance with Stroop test. *Neuroimage* 50: 1702–1710, 2010.

**Yassa M a, Stark CEL.** Pattern separation in the hippocampus. *Trends Neurosci.* 34: 515–25, 2011a.

**Yassa MA, Mattfeld AT, Stark SM, Stark CEL.** Age-related memory deficits linked to circuit-specific disruptions in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108: 8873–8878, 2011b.

**Zawadzki KM, Yaspelkis BB, Ivy JL.** Carbohydrate-protein complex increases the rate of muscle glycogen storage after exercise. *J. Appl. Physiol.* 72: 1854–1859, 1992.

## Appendices

Appendix 1: 研究課題 1 における血糖値

Group	No.	血糖値 (mM)
Pre-GL	1	5.17
	2	6.23
	3	3.11
	4	4.36
	5	4.81
	6	4.56
	7	4.69
	8	4.69
Group	No.	血糖値 (mM)
Post-GL	1	5.01
	2	4.89
	3	4.45
	4	4.51
	5	4.89
	6	5.61
	7	4.43
	8	4.58

Appendix 2 : 研究課題 1 における筋および肝グリコーゲン量

		グリコーゲン量 (μmol/g wet tissue)	
Group	No.	筋	肝臓
Pre-GL	1	62.0	628.1
	2	79.7	478.1
	3	32.5	845.5
	4	69.3	502.3
	5	91.0	666.1
	6	24.8	544.2
		グリコーゲン量 (μmol/g wet tissue)	
Group	No.	筋	肝臓
Post-GL	1	93.1	903.0
	2	101.3	730.5
	3	88.5	660.7
	4	94.1	528.2
	5	158.8	606.5
	6	109.7	515.4
	7	120.0	544.4
	8	91.4	560.0

Appendix 3 : GL が持久性能に及ぼす効果

No.	Pre-GL	Post-GL	
		GL	Sed
1	119	182	119
2	126	211	115
3	87	127	81
4	106	183	69
5	98	146	

#### Appendix 4 : 研究課題 1 における脳部位別グリコーゲン量

		グリコーゲン量 (μmol/g wet tissue)				
Group	No.	海馬	小脳	脳幹	皮質	視床下部
Pre-GL	1	11.7	12	10.1	7.3	6.7
	2	13.7	8.3	9.6	7.9	6.6
	3	11.7	10.6	8.4	8.1	6.2
	4	14.1	11	10.8	9	6.8
	5	15.3	12.4	10.8	10.6	6.2
	6	14.4	12	10.9	8.9	6.6
		グリコーゲン量 (μmol/g wet tissue)				
Group	No.	海馬	小脳	脳幹	皮質	視床下部
Post-GL	1	16.4	10.5	10.1	7.6	7.8
	2	15.8	11.3	9.6	8.4	7.5
	3	14	13.8	8.4	8.9	7.8
	4	14.6	10.7	11.4	8.8	6.1
	5	16.1	11.7	9	9.9	7.4
	6	15.1	10.9	10.8	9	7
	7	14.9	10.3	10.8	9.7	7.2
	8	14.2	10.9	10.9	9.4	6.7

Appendix 5 : 研究課題 2 - 1 における各組織のグリコゲン量

		グリコゲン量 (μmol/g wet tissue)				
Group	No.	筋	肝臓	海馬	視床下部	皮質
Pre-GL	1	65.3	459.1	81.18514	5.452718	76.8559
	2	81.3	681.9724	99.99645	6.385292	107.1325
	3	80.9	556.4233	111.4308	7.495771	105.968
	4	75	494.2146	105.3279	6.303605	97.8166
	5	77.5	574.1949	116.4257	7.673289	109.4614
	6	71	712.7777	95.54285	4.320595	97.8166
	7	71.2	775.8992	104.6386	5.174293	101.31
	8	77.3	553.7935	85.45252	4.526546	103.639
Day 5	1	113.8	1010.353	113.7688	8.47341	112.9549
	2	144.7	1155.684	117.2567	7.525862	124.5997
	3	106.8	953.8046	119.2684	8.404707	87.33624
	4	129.7	876.623	114.7688	5.215919	100.1456
	5	106.4	588.7411	128.1131	8.157849	110.6259
	6	140.1	710.936	141.939	7.3256	126.9287
	7	100.7	803.4579	111.0354	6.295995	95.48763
	8	90.3	601.972	103.2478	7.281529	102.4745
Day6	1	108.3	853.4862	115.8019	6.814003	114.1194
	2	98.6	798.7021	129.4297	8.10376	119.9418
	3	95.2	781.1151	111.6368	6.417885	98.98108
	4	117	986.2117	118.8633	5.541206	102.4745
	5	121.2	1073.799	117.8079	6.534602	118.7773
	6	100.5	650.0027	112.5853	6.596498	103.639
	7	93.5	484.9621	118.1373	10.37683	101.31
	8	95	815.7688	115.7736	6.921815	105.968
Day7	1	113.1	885.6881	123.9888	8.736919	108.2969
	2	135.1	813.67	130.7108	7.425547	110.6259
	3	108.7	785.7296	116.6294	6.696296	105.968
	4	106.1	931.5338	127.2922	8.919574	114.1194
	5	102.8	793.4615	106.9095	4.889843	100.1456
	6	103.7	638.094	115.4902	6.662931	103.639
	7	142.7	1287.167	141.3738	7.470594	112.9549
	8					



Appendix 6 : 研究課題 2 - 2 における基礎データ

Group	No.	総摂食量 (g)	総カロリー摂取量 (kcal/100g)	総糖質摂取量 (g)	体重 (g)
5%	1	119.6	294.52	4.885	307
	2	77.9	335.5438	2.78	286
	3	101	442.52	3.06	302
	4	80.1	373.7	3.775	282
	5	95.4	355.2	3.985	303
	6	76	296.37	3.96	290
	7	97.1	352.98	3.915	302
	8				
35%	1	83.1	349.3725	22.085	292
	2	97.5	307.47	24.115	292
	3	93.6	360.75	24.955	300
	4	112.6	346.32	22.19	315
	5	98.7	416.62	21.35	306
	6	86	365.19	26.46	297
	7	74.4	318.2	29.54	294
	8	79.6	275.28	32.515	288
70%	1	114.3	422.91	65.94	315
	2	78.5	290.45	57.33	289
	3	112	414.4	40.39	305
	4	100.1	370.37	29.05	285
	5	58.7	217.19	59.15	291
	6	98.6	364.82	64.54	300
	7	103.5	382.95	61.11	296
	8	89.7	331.89	55.02	275

Appendix 7 : 研究課題 2 - 2 における血糖値

	No.	Group		
		5%	35%	70%
血糖値 (mM)	1	4.77	4.65	5.01
	2	5.12	5	4.89
	3	5.19	4.43	4.45
	4	4.39	4.39	4.51
	5	4.63	4.44	4.89
	6	4.59	4.67	5.61
	7	4.72	4.27	4.43
	8		4.02	4.58

Appendix 8 : 研究課題 2 - 2 における各組織のグリコーゲン量

Group	No.	筋	肝臓	海馬	視床下部	皮質
5%	1	77.7	528.2	14.6	4.4	8.6
	2	93.4	544.4	13.4	8.2	8.8
	3	95.1	460.4	15.5	9.7	8.8
	4	91.8	412.2	14.9	7.3	10
	5	98.8	478.1	13.7	7.3	9.5
	6	99.1	391.4	15.3	6.1	8.7
	7	105.5	502.3	13.7	7.1	8.3
	8					
35%	1	92	730.5	15	6.6	9.2
	2	67	515.4	13.3	7.3	8.6
	3	90.8	571.5	15	4.6	8.9
	4	98.5	745.3	15.6	8.5	8.9
	5	98.5	583.5	14.2	9.2	8.6
	6	106.8	628.1	13.7	6.7	9.2
	7	110.7	487	14.8	8.3	9.3
	8	100	666.1	16	7.8	9.1
70%	1	93.1	903	16.4	7.8	7.6
	2	101.3	606.5	15.8	7.5	8.4
	3	88.5	828.2	14	7.8	8.9
	4	94.1	560.2	14.6	6.1	8.8
	5	158.8	987.9	16.1	7.4	9.9
	6	109.7	580.1	15.1	7	9
	7	120	845.5	14.9	7.2	9.7
	8	91.4	544.2	14.2	6.7	9.4

Appendix 9 : 研究課題 2 - 3 における各組織のグリコーゲン量

		グリコーゲン量 (μmol/g wet tissue)				
Group	No.	筋	肝臓	海馬	視床下部	皮質
高糖質食+ 安静	1	102.9053	770.0495	9.803936	5.423298	7.161453
	2	87.76498	698.9836	9.203468	6.360077	7.017159
	3	89.87799	1002.986	10.05588	5.435551	7.514996
	4	68.73341	573.705	8.525994	5.13971	5.989207
	5	75.24132	626.2692	10.59254	4.668067	7.860273
高糖質食+ 運動	1	142.4526	529.2562	10.28812	6.230268	8.06952
	2	108.0252	783.4778	10.71096	7.052844	8.363278
	3	95.76368	866.2753	11.88769	7.843561	8.074166
	4	109.9519	697.5779	10.51519	6.681409	7.329227

Appendix 10 : 研究課題 2 - 4 における各組織のグリコーゲン量

Group	No.	筋	肝臓	海馬	視床下部	皮質
安静	1	77.6	457.4586	11.2	7.7	8.6
	2	56.3	634.3075	11.2	6.7	7.5
	3	76.1	722.7705	13	6.8	7.9
	4	74.9	369.7805	11.7	6.8	7
	5	63.3	533.519	11.8	5.5	7.6
	6	68.6	485.6416	10.6	6	7.8
	7	56.1	419.2432	11.5	7.3	7.3
	8	70.2	447.633	12.5	6.8	8.5
	9	64.1	648.628			8.9
	10	69.2	612.0181			8.3
中強度	1	77.5	608.1877	12.6	5.9	7.8
	2	69.7	474.5201	12.8	5.8	8.7
	3	81.2	589.027	12.2	7.7	7.7
	4	63.9	328.4762	11.4	5.6	7.7
	5	59.3	372.147	12.4	6.6	8
	6	65.3	762.1057	12.1	7.1	7.6
	7	72.3	521.5795	11.4	6	7.9
	8	80.8	493.2369	12.3	5.7	7.5
	9	76.7	455.5217	11.4	5.7	8.2
	10	58.2	351.8501	11.7	6.6	8.7
疲労困憊	1	74.7	395.015	13.3	7.6	7.3
	2	79.5	479.2252	12.5	6.3	8.2
	3	61.8	641.2531	12	7	7.5
	4	69.7	649.2876	13.4	7.7	9.1
	5	70	476.1532	11.9	7.1	8
	6	67.7	592.8207	12.8	9.2	7.6
疲労困憊 + 中強度	1	66.9	427.9492	12.9	7.7	7.6
	2	66.3	295.643	13.3	6.8	8.8
	3	75.4	342.4135	12.6	7.3	7.5
	4	67.2	536.6032	12.5	8.4	8
	5	67.7	820.8705	12.9	6.6	9.1

## Appendix 11 : 研究課題 3 - 1 における新奇物体識別率

## Appendix 12 : 研究課題 3 - 2 低類似度課題での総探索行動量

## Appendix 13 : 研究課題 3 - 2 低類似度課題での新奇物体識別率



## Appendix 14 : 研究課題 3 - 2 高類似度課題での総探索行動量

Appendix 15 : 研究課題 3 - 2 高類似度課題での新奇物体識別率